

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 特許公報 (B2)

(11)特許番号

特許第3398382号
(P3398382)

(45)発行日 平成15年4月21日(2003.4.21)

(24)登録日 平成15年2月14日(2003.2.14)

(51) Int.Cl.
C 07 K 16/28
A 61 K 39/395
A 61 P 35/00
C 12 N 15/02
15/09

識別記号

F I
C 07 K 16/28
A 61 K 39/395 T
A 61 P 35/00
C 12 P 21/02 C
21/08

請求項の数11(全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平6-510999

(86) (22)出願日

平成4年10月28日(1992.10.28)

(65)公表番号

特表平8-502514

(43)公表日

平成8年3月19日(1996.3.19)

(86)国際出願番号

PCT/US92/09218

(87)国際公開番号

WO94/010202

(87)国際公開日

平成6年5月11日(1994.5.11)

審査請求日

平成11年10月25日(1999.10.25)

(73)特許権者

99999999
ジェネンテク、インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア
94080-4990、サウス・サンフランシスコ、ディーエヌエイ・ウェイ 1

(72)発明者

フェララ、ナボレオン
アメリカ合衆国カリフォルニア94123、
サン・フランシスコ、ナンバー306、スコット3835番

(72)発明者

キム、ウン・ジン
アメリカ合衆国カリフォルニア94112、
サン・フランシスコ、イーストウッド・ドライブ94番

(74)代理人

99999999
弁理士 青山 葵 (外1名)

審査官 富永 みどり

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血管内皮細胞増殖因子アンタゴニスト

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】抗VEGF抗体であるhVEGFアンタゴニストを治療有効量含有する、癌を治療するための組成物。

【請求項2】抗体が抗hVEGF抗体である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】抗体がモノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】抗体がヒト型化されている、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項5】抗体が腫瘍サイズを減少させるのに充分な量で用いられる、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】腫瘍が固形悪性腫瘍である、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】抗体がVEGF介在脈管形成を阻止することに

より腫瘍サイズを減少させる、請求項5または6に記載の組成物。

【請求項8】抗体が細胞毒性部分に結合している、請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項9】細胞毒性部分がタンパク質細胞毒素またはモノクローナル抗体のFcドメインである、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】他の癌の治療剤と、連続的にまたは同時に投与されるように処方される、請求項1～9のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項11】放射線学的治療に対して、連続的にまたは同時に投与されるように処方される、請求項1～10のいずれか1項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本願発明は、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）アンタゴニスト、該アンタゴニストを含む治療用組成物並びに診断および治療目的に該アンタゴニストを使用する方法に関するものである。

発明の背景

脈管系の2つの主要な細胞成分は内皮細胞と平滑筋細胞である。内皮細胞は全血管の内部表面の内張りを形成し、血液と組織の間の非凝塊形成性界面を構成する。加えて、内皮細胞は新しい毛細血管や血管の発育の重要な成分である。それ故、内皮細胞は腫瘍増殖および転移並びに種々の非新生物疾病または疾患に関連して、脈管形成または新血管形成中に増殖する。

天然に生じる種々のポリペプチドは内皮細胞の増殖を誘発することが報告されている。これらのポリペプチドには、塩基性および酸性の纖維芽細胞増殖因子（FGF）、ブルグス（Burgess）およびマシアグ（Maciag）、*Annual Rev. Biochem.*、58:575 (1989年)、血小板由来内皮細胞増殖因子（PD-ECGF）、イシカワ（Ishikawa）等、*Nature*、338:557 (1989年)、並びに血管内皮増殖因子（VEGF）、リュング（Leung）等、*Science*246:1306 (1989年)；フェララ（Ferrara）およびヘンゼル（Henzel）、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161:851 (1989年)；ティッシャー（Tescher）等、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:1198 (1989年)；フェララ等、PCT公開特許第W090/13649号（1990年11月15日公開）；フェララ等、米国特許出願第07/360,229号がある。

VEGFは最初、ウシ下垂体細胞または星状小胞細胞で条件づけた培地で同定された。生化学分析によって、ウシVEGFは二量体タンパク質であって、見かけ上の分子量は約45,000ダルトンであり、血管内皮細胞に対して明白な細胞分裂誘発性特異を有していることが示される。ウシVEGFをコードするDNAは、ハイブリッド形成プローブとしてタンパク質のアミノ末端アミノ酸配列に基づくオリゴヌクレオチドを使用して上記細胞から調製したcDNAライブラリーをスクリーニングして単離された。

ヒトVEGFは、ウシVEGF cDNAをハイブリッド形成プローブとして使用して、ヒト細胞から調製したcDNAライブラリーを先ずスクリーニングして得られた。こうして同定された1つのcDNAは、ウシVEGFと95%以上の相同性を有する165アミノ酸のタンパク質をコードしており、このタンパク質はヒトVEGF（hVEGF）と称されている。ヒトVEGFの細胞分裂誘起性は、哺乳動物宿主細胞中でヒトVEGF cDNAを発現することによって確認された。ヒトVEGF cDNAでトランスフェクションした細胞で条件づけた培地は毛細血管内皮細胞の増殖を促進したが、一方対照細胞では促進しなかった。リュング等、*Science*246:1306 (1989年)。

更に幾つかのcDNAが、hVEGFは121-、189-および206-アミノ酸イソ形態をコードするヒトcDNAライブリー中で同定された。121-アミノ酸タンパク質は、hVEGFの残

基116から159の間の44個のアミノ酸を欠失しているためhVEGFと異なっている。189-アミノ酸タンパク質は、hVEGFの残基116に24個のアミノ酸挿入があるためhVEGFと異なっており、明らかにヒト血管透過性因子（hVPPF）と同一である。206-アミノ酸タンパク質は、hVEGFの残基116に41個のアミノ酸の挿入があるためhVEGFと異なっている。フック（Houck）等、*Mol. Endocrin.* 5:1806 (1991年)；フェララ等、*J. Cell. Biochem.* 47:211 (1991年)；フェララ等、*Endocrine Reviews* 13:18 (1992年)；ケック（Keck）等、*Science* 246:1309 (1989年)；コノリ（Connolly）等、*J. Biol. Chem.* 264:20017 (1989年)；ケック等、EPO公開特許第0 370 989号 (1990年5月30日公開)。

VEGFは血管内皮細胞増殖を刺激するだけでなく、血管透過性および脈管形成も誘発する。以前から存在する内皮から新しい血管の形成に係わっている脈管形成は、腫瘍増殖および転移、リウマトイド関節炎、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜性、後水晶体纖維増殖症、血管新生性線内障、血管腫、移植した角膜組織や他の組織の免疫拒絶並びに慢性炎症を含む多種の疾病や疾患の重要な成分である。

腫瘍増殖の場合には、脈管形成が過形成から新生物形成への変移および増殖中の固形腫瘍への栄養供給に決定的に重要であるように思われる。フォークマン（Folkman）等、*Nature* 339:58 (1989年)。また、脈管形成は腫瘍と宿主の血管床の接触を可能にし、この血管床が腫瘍細部の転移経路を提供すると思われる。腫瘍転移における脈管形成の役割の証拠は、例えば、侵入性ヒト乳癌の組織学的切片中の微小血管の数および密度と実際の遠位転移の存在との間の関係を示す研究によって提供されている。ワイドナー（Weidner）等、*New Engl. J. Med.* 324:1 (1991年)。

血管内皮細胞増殖および脈管形成の役割並びに多数の疾病や疾患におけるこれらの過程を考慮して、VEGFの1つまたはそれより多い生物学的效果を減少させるかまたは阻止する手段を有することが望ましい。正常状態および病理学的状態、特に癌でのVEGFの存在をアッセイする手段を有することも望ましい。

発明の要約

本願発明はVEGFのアンタゴニストを提供し、これらには(a) hVEGF、hVEGFレセプター、またはhVEGFレセプターと会合したhVEGFを含むコンプレックスと特異的に結合できる抗体およびそれらの変体、(b) hVEGFレセプターおよびそれらの変体、並びに(c) hVEGFの変体が含まれる。これらのアンタゴニストはhVEGFの細胞分裂活性、脈管形成活性または他の生物学的活性を阻止するので、望ましくない過度の血管新生を特徴とする疾病または疾患の治療に有用であり、これらの例としては腫瘍、そして特に固形悪性腫瘍、リウマトイド関節炎、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他

の網膜症、後水晶体纖維増殖症、血管新生性緑内障、血管腫、甲状腺過形成（バセドウ病を含む）、角膜および他の組織の移植、並びに慢性炎症が含まれる。また、これらのアンタゴニストは望ましくない過度の血管透過性、例えば、脳腫瘍に関連した浮腫、悪性物に関連した腹水、メーグス症候群、肺炎症、ネフローゼ症候群、心膜滲出液（例えば、心膜炎に関連するもの）、並びに胸膜滲出液を特徴とする疾患または疾患の治療にも有用である。

他の特徴としては、VEGFアンタゴニストは、(a) 非hVEGFエピトープ、例えば、血栓形成若しくは血栓溶解に係わるタンパク質のエピトープ、または腫瘍細胞表面抗原、および(b) hVEGF、hVEGFレセプターまたはhVEG Fレセプターと会合したhVEGFを含むコンプレックスと結合し得る多特異性モノクローナル抗体である。

更に他の特徴としては、VEGFアンタゴニストは細胞毒性部分と抱合体を形成する。

もう1つの特徴としては、本発明は、上記したようなモノクローナル抗体をコードする単離核酸およびこのようなモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株に関するものである。

もう1つの特徴としては、本発明は、哺乳動物のhVEG F介在細胞分裂活性または脈管形成活性を減少させるかまたは消失させるのに有効量のVEGFアンタゴニストを含む製薬組成物に関するものである。

別の特徴としては、本発明は、哺乳動物、好ましくは治療を必要としているヒト患者に生理学的に有効量のVE GFアンタゴニストを投与することを含む治療方法に関するものである。所望の場合、VEGFアンタゴニストは1つまたはそれより多い他のVEGFアンタゴニストまたは抗腫瘍若しくは抗脈管形成物質と同時に、または順次投与する。

もう1つの特徴としては、本発明は、hVEGFと特異的に結合し、このような結合の程度を測定し得る抗体と試験試料を接触させることによって試験試料中のhVEGFを検出する方法に関するものである。

図面の簡単な説明

図1は、抗hVEGFモノクローナル抗体とhVEGFとの結合に与える抗hVEGFモノクローナル抗体（A4.6.1またはB2.6.2）または無関係の抗肝細胞増殖因子抗体（抗-HGF）の効果を示すものである。

図2は、ウシ副腎皮質毛細血管内皮（ACE）細胞培養物中のhVEGFの生物学的活性に与える抗hVEGFモノクローナル抗体（A4.6.1またはB2.6.2）または無関係の抗-HGF抗体の効果を示すものである。

図3は、hVEGFとウシACE細胞の結合に与える抗hVEGFモノクローナル抗体（A4.6.1、B2.6.2またはA2.6.1）の効果を示すものである。

図4は、マウスにおけるNEG55腫瘍増殖の増殖速度に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体処置の効果を

示すものである。

図5は、処置から5週間後のマウスにおけるNEG55腫瘍の大きさに与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体処置の効果を示すものである。

図6は、マウスにおけるSK-LMS-1腫瘍の増殖に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体（VEGF Ab）処置の効果を示すものである。

図7は、マウスにおけるA673腫瘍の増殖に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体（VEGF Ab）処置の種々の投与量の効果を示すものである。...は...に示す。（SIC;is shown in)

図8は、培養物中のNEG55（G55）膠芽腫細胞の増殖および生存に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体の効果を示すものである。

図9は、培養物中のA673横紋筋肉腫細胞の増殖および生存に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体の効果を示すものである。

図10は、ヒト内皮細胞のヒト滑液誘発走化性に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体の効果を示すものである。

発明の詳細な説明

本願明細書で使用する、用語「hVEGF」は、リュング等、Science246:1306（1989年）およびフック等、Mol. Endocrin. 5:1806（1991年）が記載したような165-アミノ酸ヒト血管内皮細胞増殖因子並びに関連のある121-、189-および206-アミノ酸血管内皮細胞増殖因子と、これら増殖因子の天然生起の対立遺伝子体および処理体を呼称する。

本願発明は、hVEGFの1つまたはそれより多い生物学的活性、例えば、その細胞分裂誘起活性または脈管形成活性を阻止し得るhVEGFのアンタゴニストを提供する。hVEGFのアンタゴニストは、hVEGFと細胞レセプターの結合を妨げ、hVEGFによって活性化されている細胞を無能化若しくは殺害し、またはhVEGFと細胞レセプターの結合後に血管内皮細胞活性化を妨げることによって作用する。hVEGFアンタゴニストによる干渉の上記の要点は全て、本願発明の目的では等価であると考えるべきである。それ故、hVEGF、hVEGFレセプターまたはhVEGFレセプターと会合したhVEGFを含むコンプレックスと結合する抗体、そして好ましくはモノクローナル抗体、またはそれらのフラグメントが本発明の範囲内に含まれる。更に、hVEGFレセプターと結合するが天然hVEGFの生物学的活性を示さないhVEGFのフラグメントおよびアミノ酸改変体も本発明の範囲内に含まれる。更に、hVEGFを結合し得るhVEGFレセプター並びにそれらのフラグメントおよびアミノ酸配列改変体も本発明の範囲内に含まれる。

本願明細書で使用する、用語「hVEGFレセプター」または「hVEGFr」はhVEGFの細胞レセプター、通常は血管内皮細胞に見られる細胞表面レセプター、並びにhVEGF

を結合する能力を保持しているそれらの改変体を呼称する。典型的には、hVEGFアンタゴニストであるhVEGFレセプターおよびそれらの改変体は、天然での場合のように細胞膜中に組み入れられるかまたは細胞表面に固定されているというよりむしろ単離された形態である。hVEGFレセプターの1つの例はfms様チロシンキナーゼ(flt)、即ちチロシンキナーゼ属のトランスメンブランレセプターである。デブリーズ(DeVries)等、*Science* 255:989 (1992年) ; シブヤ(Shibuya)等、*Oncogene* 5:519 (1990年)。fltレセプターには細胞外ドメイン、トランスメンブランドメインおよび細胞内ドメインが含まれ、チロシンキナーゼ活性を有している。細胞外ドメインはhVEGFの結合に係わっており、一方細胞内ドメインはシグナル導入に係わっている。

hVEGFレセプターのもう1つの例はflk-1レセプター(KDRとも称される)である。マシューズ(Matthews)等、*Proc. Nat. Acad. Sci.* 88:9026 (1991年) ; ターマン(Terman)等、*Oncogene* 6:1677 (1991年) ; ターマン等、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1579 (1992年)。

hVEGFとfltレセプターの結合によって、見かけ上の分子量が205,000と300,000ダルトンである少なくとも2つの高分子量コンプレックスが形成される。300,000ダルトンのコンプレックスはhVEGF1分子にレセプター2分子が結合したものを含む二量体であると考えられる。

hVEGFrの改変体も本願明細書の範囲内に含まれる。代表的な例には、トランスメンブランおよび細胞質ドメインがレセプターから欠失しているレセプターの切断された形態、および非hVEGFrポリマーまたはポリペプチドがhVEGFrと抱合している融合タンパク質、または好ましくはそれらの切断された形態が含まれる。このような非hVEGFポリペプチドの例は免疫グロブリンである。その場合には、例えば、hVEGFrの細胞外ドメインは免疫グロブリンLまたは(好ましくは)H鎖のFvドメインと置換しており、レセプターの細胞外ドメインのC末端はH鎖のCH1、ヒンジ、CH2または他のフラグメントのアミノ末端と共有結合している。このような改変体は既知の免疫付着と同じ形態で製造される。例えば、ガスコイン(Gascogne)等、*Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:2936 (1987年) ; カポン(Capon)等、*Nature* 337:525 (1989年) ; アルフオ(Aruffo)等、*Cell* 61:1303 (1990年) ; アッシュケナジ(Ashkenazi)等、*Proc. Nat. Acad. Sci.* 88:10535 (1991年) ; ベネット(Bennett)等、*J. Biol. Chem.* 266:23060 (1991年) 参照。他の実施態様では、hVEGFrは、ポリエチレンギリコール(PEG)のような非タンパク性ポリマー(例えば、デービス(Davis)等、英国特許第4,179,337号; グッドソン(Goodson)等、*BioTechnology* 8:343~346 (1990年) ; アバチョウスキイ(Abuchowski)等、*J. Biol. Chem.* 252:3578 (1977年) ; アバチョウスキイ等、*J. Biol. Chem.* 252:3582 (1977年) 参照)また

は炭水化物(例えば、マーシャル(Marshall)等、*Arc h. Biochem. Biophys.* 167:77 (1975年) 参照)と抱合している。これは、hVEGFrの生物学的半減期を延長し、レセプターが投与される哺乳動物で免疫原性である可能性を減少させるのに役立つ。hVEGFrは、アンタゴニストの親和性およびhVEGFに対するその原子価を考慮して、hVEGFの抗体と実質的に同じ形態で使用される。

hVEGFレセプター自体または免疫グロブリンポリペプチド若しくは他の担体ポリペプチドと融合したhVEGFレセプターの細胞外ドメインは、宿主中に存在しているが細胞表面のhVEGFrと結合していないhVEGFを隔離する能力によって、hVEGFのアンタゴニストとして特に有用である。

hVEGFrとその改変体は、hVEGFのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するスクリーニングアッセイにも有用である。例えば、hVEGFr(例えば、fltまたはflk1)をコードするDNAでトランスフェクションされた宿主細胞は細胞表面でレセプターポリペプチドを過剰発現し、このような組換え体宿主細胞は試験化合物(例えば、小分子、線状若しくは環状ペプチドまたはポリペプチド)のhVEGFrとの結合能の分析に理想的に適合させられる。hVEGFrおよびhVEGFr融合タンパク質、例えばhVEGFr-IgG融合タンパク質は類似の形態で使用することができる。例えば、融合タンパク質を固定支持体に結合させ、試験化合物が融合タンパク質のhVEGFrドメインから放射標識hVEGFを追い出す能力を測定する。

hVEGF、hVEGFレセプター、モノクローナル抗体または他のタンパク質に関して使用される用語「組換え体」は、宿主細胞中で組換え体DNA発現によって産生されるタンパク質を呼称する。宿主細胞は原核細胞(例えば、大腸菌のような細菌細胞)または真核細胞(例えば、酵母または哺乳動物細胞)でありうる。

アンタゴニストモノクローナル抗体

本願明細書で使用する、用語「モノクローナル抗体」は実質的に同種の抗体集団から得られる抗体、即ち、少量で存在することがある天然生起の突然変異を除いて、特異性および親和性が同一の集団を構成する個々の抗体を呼称する。上記の天然生起の突然変異等の結果として、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGFrと会合したhVEGFを含むコンプレックス(「hVEGF-hVEGFrコンプレックス」)と特異的に結合し得る抗体を主として含有する本発明のモノクローナル抗体組成物は少量の他の抗体も含有する可能性があることを認めなければならない。

それ故、修飾語「モノクローナル」は、このような実質的に同種の抗体集団から得られるような抗体の特徴を示すものであって、何か特別の方法で抗体が产生されることを要求していると考えるべきでない。例えば、本発明のモノクローナル抗体は、最初にコーラー(Kohler)およびミルスタイン(Milstein)、*Nature* 256:495 (1975年)が記載したハイブリドーマ方法を使用して製造す

ることができ、または組換えDNA方法によって製造することができる。カビリ (Cabilly) 等、米国特許第4,816,567号。

ハイブリドーマ方法では、マウスまたは他の適当な宿主動物を皮下、腹腔内、または筋肉内経路で抗原を用いて免疫化して、免疫化に使用されたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生するかまたは産生し得るリンパ球を誘引する。或いは、リンパ球をインピトロで免疫化することができる。次に、リンパ球はポリエチレングリコールのような適当な融合剤を使用してミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を形成させる。ゴーディング (Goding) のモノクローナル抗体：原理および実施、59～103頁 (Academic Press、1986年)。

抗原はhVEGF、hVEGFr、またはhVEGF-hVEGFrコンプレックスであることがある。抗原は任意に、hVEGFとそのレセプターの1つとの結合に関与する1つまたはそれより多いアミノ酸残基を有するhVEGFまたはhVEGFrのいずれか1つのフラグメントまたは部分である。例えば、hVEGFrの細胞外ドメイン（即ち、トランスメンブランおよび細胞内ドメインを欠失している切断hVEGFrポリペプチド）による免疫化は、hVEGF結合に係わっているのは細胞外ドメインであるので、hVEGFのアンタゴニストである抗体を産生するのに特に有用である。

hVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合し得るモノクローナル抗体は、特に、それらが非会合（コンプレックス化されていない）hVEGFおよびhVEGFrにも結合しない場合、有用である。それ故、このような抗体はhVEGFによって直接的な活性化を受けている細胞とだけ結合し、從って哺乳動物中に通常見られる遊離hVEGFまたはhVEGFrでは結合されない。このような抗体は典型的には、レセプターとhVEGF間の1つまたはそれ以上の接点に及びエピトープと結合する。このような抗体は他のリガンドレセプターコンプレックスに対して産生されており、ここで同じ様で産生させることができる。これらの抗体は、抗体が非会合hVEGFまたはhVEGFrと結合し得るか否かに拘わらず、非会合hVEGF若しくはhVEGFrの生物学的活性を無効化または阻止する必要はなく、無効化または阻止することもできない。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞は、融合していない親ミエローマ細胞の増殖または生存を阻止する1つまたはそれより多い物質を好ましくは含有する適当な培養培地に接種し、増殖させる。例えば、親ミエローマ細胞が酵素ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ (HGPRTまたはHPRT) を欠いている場合、ハイブリドーマ用の培養培地は典型的にはヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含有し (HAT培地) 、これら物質はHGPRT欠損細胞の増殖を阻止する。

好ましいミエローマ細胞は効率的に融合する細胞であり、選択した抗体産生細胞による抗体の安定した高レベ

ル発現を支持し、HAT培地のような培地に感受性である。これらのなかで、好ましいミエローマ細胞株はネズミミエローマ株、例えば、米国カリフォルニア州サンジエゴのサーク インスチチュート セル ディストリビューション センター (Salk Institute Cell Distribution Center) から入手できるMOPC-21およびMOPC-11マウス腫瘍、米国メリーランド州ロックビルの米国菌培養収集所 (ATCC) から入手できるSP-2細胞、およびエルトン (Yelton) 等がCurr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 1 (1978年) に記載したP3X63Ag8U. 1細胞から誘導されるものである。ヒトミエローマおよびマウスヒトヘテロミエローマ細胞株もヒトモノクローナル抗体の産生に関して記載されている。コズボル (Kozbor) 、J. Immunol. 133: 3001 (1984年) 。ブロデュア (Brodeur) 等のモノクローナル抗体産生技術および応用、51～63頁 (Marcel Dekker, Inc. ニューヨーク、1987年)。

ハイブリドーマ細胞が増殖している培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降法またはインピトロ結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ (RIA) または酵素結合免疫吸着剤アッセイ (ELISA) によって測定する。本発明のモノクローナル抗体は、hVEGF、hVEGFr若しくはhVEGF-hVEGFrコンプレックスを優先的に免疫沈降させるかまたは結合アッセイで上記抗原の少なくとも1つと優先的に結合し、hVEGFの生物学的活性を阻止し得るものである。

ハイブリドーマ細胞が所望の特異性、親和性および活性のアンタゴニスト抗体を産生することを確認した後、クローンは限界希釈法でサブクローン化し、標準方法で増殖させることができる。ゴーディングのモノクローナル抗体：原理および実施、59～104頁 (Academic Press、1986年)。この目的に適する培養培地には、例えば、ダルベッコの修正イーグル培地またはRPMI-1640培地が含まれる。更に、ハイブリドーマ細胞は動物の腹水腫瘍としてインピボで増殖させることができる。

サブクローンが分泌したモノクローナル抗体は、例えば、タンパク質A-セファロース、ヒドロキシアバタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティクロマトグラフィーのような慣用の免疫グロブリン精製方法を使用して培養培地、腹水または血清から適切に分離される。

本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは容易に単離されそして慣用の方法を使用して（例えば、ネズミ抗体のHおよびL鎖をコードする遺伝子と特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用して）配列が決定される。本発明のハイブリドーマ細胞はこのようなDNAの好ましい供給源として役立つ。1度単離されると、DNAを発現ベクターに入れ、次にこれをシミアンCHO細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞また

はミエローマ細胞のような宿主細胞中にトランスフェクションして組換え体宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成を得る。上記細胞はトランスフェクションしない場合、免疫グロブリンタンパク質を產生しない。

[DNAの] 発現によって產生される免疫グロブリンの特徴を変えるために、DNAは任意に修飾することができる。例えば、ネズミ抗体のヒト型化形態は、ネズミ抗体可変部の相補性決定領域（CDR）でヒト抗体の対応する領域を置換することによって產生される。或る実施態様では、ネズミ抗体の選択された枠組み領域（FR）アミノ酸残基でもヒト抗体中の対応するアミノ酸残基を置換する。カーター（Carter）等、Proc. Nat. Acad. Sci. 89:4285 (1992年)；カーター等、BioTechnology 10:163 (1992年)。ネズミ抗体のキメラ形態も、選択したヒトHおよびI鎖不变部のコード化配列を同種ネズミ配列の適所に置換して產生される。カビリ等、米国特許第4,816,567号；モリソン（Morrison）等、Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851 (1984年)。

本発明の範囲内に含まれる抗体には、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックス並びに非hVEGFエピトープと結合し得る免疫グロブリン鎖を有するキメラ（「ヒト型化」を含む）抗体およびハイブリッド抗体のような改変体抗体が含まれる。

本願明細書の抗体には、全ての起源種、並びに免疫グロブリンクラス（例えば、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM）およびサブクラス、並びに抗体フラグメント（例えば、Fab、F(ab')2およびFv）は、これらがhVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合可能であり、hVEGFの生物学的活性と拮抗し得る限り、これらが含まれる。

本発明の好ましい実施態様では、モノクローナル抗体は、例えば、ムンソン（Munson）およびポラード（Pollar）、Anal. Biochem. 107:220 (1980年) のスカッチャード分析によって測定するとき、免疫化抗原に対して少なくとも約 10^9 リットル [sic; liters] / モルの親和性を有する。更に、モノクローナル抗体は典型的には、例えば、実施例2に記載するようなインピトロ細胞生存または増殖アッセイによって測定するとき、hVEGFの細胞分裂誘起性活性または脈管形成活性を少なくとも約50%、好ましくは80%以上、そして最も好ましくは90%以上阻止する。

或る治療的および診断的適用では、モノクローナル抗体がhVEGFの種々の分子形態の全てとは反応性でないことが望ましい。例えば、165-アミノ酸配列hVEGFとは特異的に結合できるが121-または189-アミノ酸配列hVEGFポリペプチドとは結合しないモノクローナル抗体を有することが望ましい。このような抗体は種々のhVEGFポリペプチドの比較ELISAアッセイまたは比較免疫沈降法によって容易に同定される。

細胞毒性部分との抱合体

或る実施態様では、hVEGF特異性のモノクローナル抗体またはhVEGFrと抱合した細胞毒性部分を提供することが望ましい。これらの実施態様では、細胞毒素はhVEGF若しくはそのレセプターを発現または結合している細胞を無効化するかまたは殺害するのに役立つ。hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合し得るドメインによって抱合体を細胞に対して標的化させる。かくして、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合できるモノクローナル抗体を細胞毒素と抱合させる。同様に、hVEGFrを細胞毒素と抱合させる。モノクローナル抗体は最も望ましくは、hVEGF単独（細胞毒素を有していない）の活性を無効化できるが、この実施態様ではモノクローナル抗体またはレセプターがhVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスとまで結合できる必要はない。

或るクラスの免疫グロブリンの或るクラスの場合には、モノクローナル抗体自体のFcドメインが細胞毒素を提供するのに役立つことがある（例えばIgG2抗体の場合には、該抗体は補体を固定し、抗体依存性細胞毒性（ADCC）に関与することができる）が、典型的には、細胞毒素はタンパク質細胞毒素、例えばジフテリア、リシンまたはシードモナス毒素である。しかし乍ら、細胞毒素はタンパク質である必要はなく、例えば腫瘍治療用にこれまでに使用された化学療法剤を含めることができる。

細胞毒素は典型的には、抗体のFcドメイン内で（または[Fcドメイン]1部若しくは全ての適所で）バックボーンアミド結合によってモノクローナル抗体またはそのフラグメントと結合する。標的化機能がhVEGFrによって供給される場合、細胞毒性部分はhVEGF結合に関与しないレセプターの任意のドメイン上に置換され；好ましくは、該部分はレセプターのトランスマembranおよび/または細胞質ドメインの代わりまたは該ドメイン上に置換される。最適の置換部位は定型的な実験によって決定され、十分通常の技量の範囲内である。

タンパク質融合体である抱合体は、抱合体をコードする遺伝子を発現させることによって組換え体細胞培養物中で容易に製造される。或いは、抱合体は、例えば、イミノチオレートやメチル-4-メルカプトチルイマデートを使用して、チオエステル結合によるジスルフィド交換または結合のような自体既知の方法を使用して、細胞毒性部分を抗体またはレセプターのアミノ酸残基側鎖またはC末端カルボキシルに共有的に交差結合させて製造される。

他の部分との抱合体

hVEGFのアンタゴニストであるモノクローナル抗体およびhVEGFrも、それら自体では細胞毒素として容易には分類されないが本願明細書の組成物の活性を増す物質と抱合する。例えば、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合し得るモノクローナル抗体またはhVEGFrは、ウイルス配列のような異種ポリペプチド、細

胞レセプター、TNF、インターフェロンまたはインテロイキンのようなサイトカイン、凝血促進活性を有するポリペプチドおよび他の生物学的または免疫学的に活性のポリペプチドと融合する。このような融合体は組換え体方法によって容易に製造される。典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドで抗hVEGF若しくは抗hVEGF-hVEGFrコンプレックス抗体の不变ドメイン、またはhVEGFrのトランスマンプランおよび/または細胞内ドメインを置換する。或いは、上記ポリペプチドで、本願明細書に記載した抗hVEGF抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインを置換する。

好ましい実施態様では、このような非免疫グロブリンポリペプチドは本願明細書に記載した抗体の不变ドメインと結合されるかまたはそれらに置き換わる。ベネット等、*J. Biol. Chem.* 266:23060~23067 (1991年)。或いは、上記ポリペプチドで本願明細書の抗体のFvを置換し、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスに対して特異性を有する少なくとも1つの残存抗原結合部位および出発抗体とは異なる機能または特異性を有する代用抗原結合部位を含むキメラ多価抗体が創製される。

異種特異性抗原

hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合し得るモノクローナル抗体は、列挙したエピトープ、典型的には1つのH-L鎖コンプレックスまたはそのフラグメントに対して1つの結合部位を有してさえいれば良い。しかし乍ら、このような抗体は任意に、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスのいずれの内部にも見られないエピトープと結合し得る抗原結合ドメインも有している。例えば、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックス以外の抗原に対して特異性を有する抗体の相補性決定残基および、必要な場合、枠組み残基を有する、天然の抗hVEGF、抗hVEGFrまたは抗hVEGF-hVEGFrコンプレックス抗体の対応するアミノ酸配列またはアミノ酸残基で置換することによって、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスに特異性を有する1つの抗原結合部位および非hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックス抗原に特異性を有するもう1つの抗原結合部位を含む多特異的抗体が創製される。これらの抗体は少なくとも二価であるが、選択した抗体クラスによって所有される抗原結合部位数に従って、多価であることもできる。例えば、IgMクラスの抗体は多価である。

本発明の好ましい実施態様では、上記の抗体はhVEGFまたはhVEGFrエピトープと、(a)タンパク質C若しくは組織因子のような血液凝固に活性のポリペプチド、(b)腫瘍壞死因子(TNF)のような細胞毒性タンパク質、または(c)CD4若しくはHER-2レセプターのような非hVEGFr細胞表面レセプターのいずれかと結合することができる(Maddon等、*Cell* 42:93 (1985

年)；コーセンス(Coussens)等、*Science* 230:1137 (1985年)。異種特異性の多価抗体は宿主細胞と両抗体のHおよびL鎖をコードするDNAを共形質転換させ、その後免疫アフィニティークロマトグラフィ等によって回収して都合よく製造され、発現された抗体の部分は所望の抗原結合特性を有している。或いは、このような抗体はモノ特異性抗体のインビトロ組換えによって製造される。

一価抗体

hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合し得る一価抗体はhVEGFのアンタゴニストとして特に有用である。本発明は生物学的活性のどの特別のメカニズムにも限定されることなく、細胞hVEGFレセプターの活性化は、hVEGFと細胞hVEGFレセプターとの結合がレセプターの凝固を誘発し、順次細胞内レセプターキナーゼ活性を活性化するというメカニズムで進行すると考えられる。一価の抗hVEGFレセプター抗体はこのような凝固を誘発できず、それ故上記メカニズムによってhVEGFレセプターを活性化できないので、上記抗体はhVEGFの理想的なアンタゴニストである。

しかし乍ら、これらの抗体はレセプターのhVEGF結合部位を指向するかまたはそうでない場合hVEGFレセプターと結合するhVEGFを、例えばレセプターに対するhVEGFの接近を立体的に障害することによって、妨げることが可能でなければならないことに注意すべきである。しかし乍ら、本願明細書の他の場所で記載したように、hVEGFの結合を妨げることができない抗hVEGFr抗体は、非免疫グロブリン部分、例えば細胞毒素と抱合したとき有用である。

一価抗体の製造方法は当該技術分野で良く知られている。例えば、1つの方法は免疫グロブリンL鎖および修飾したH鎖の組換え体発現に係わるものである。H鎖は一般に、H鎖架橋を防止するように、Fc領域の任意の点で切断される。或いは、関連システイン残基は、架橋を防止するようにもう1つのアミノ酸残基で置換されるかまたは消失される。インビトロ方法も、一価抗体の製造に適している。例えば、Fabフラグメントは無傷抗体の酵素開裂によって製造される。

診断用途

診断適用では、本発明の抗体またはhVEGFrは典型的には検出可能部分で標識される。検出可能部分は、検出可能シグナルを直接的にまたは間接的に作ることができる任意のものであることができる。例えば、検出可能部分は、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S若しくは¹²⁵Iのような放射性同位元素、蛍光イソチオシアネート、ローダミン若しくはルシフェリンのような蛍光または化学ルミネセンス化合物、例えば¹²⁵I、³²P、¹⁴C若しくは³Hのような放射性同位元素標識、またはアルカリホスファターゼ、ペーターガラクトシダーゼ若しくはホースラディッシュペルオキシダーゼのような酵素でありえる。

抗体またはhVEGFrを検出可能部分と別個に抱合させる当該技術分野で既知の任意の方法を使用することができ、これらの方法にはハンター (Hunter) 等、Nature 144:945 (1962年) ; デービッド (David) 等、Biochemistry 13:1014 (1974年) ; ペイン (Pain) 等、J. Immunol. Meth. 40:219 (1981年) ; およびニグレン (Nygren) 、J. Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982年) が記載した方法が含まれる。

本願発明の抗体およびレセプターは既知の任意のアッセイ方法、例えば競合結合アッセイ、直接および間接的サンドイッチアッセイおよび免疫沈降アッセイを使用することができる。ゾラ (Zola) 、モノクローナル抗体：技術マニュアル、147～158頁 (CRC Press, Inc.、1987年)。

競合結合アッセイは標識標準品（これはhVEGFまたはその免疫学的に反応性の部分でありえる）の一定量の抗体と結合する試験試料アナライト (analyte) (hVEGF) との競合能力に依拠している。試験試料中のhVEGF量は、抗体またはレセプターと結合されることになる標準品の量に逆比例する。結合されることになる標準品の量の測定を促進するために、抗体またはレセプターは一般に競合前後に不溶化されるので、抗体またはレセプターと結合する標準品およびアナライトは結合していない標準品およびアナライトから好都合に分離することができる。

サンドイッチアッセイは、検出すべきタンパク質の種々の免疫原性部分またはエピトープと結合し得る2つの抗体またはレセプターを使用することに係るものである。サンドイッチアッセイでは、試験試料アナライトは固形支持体に固定されている第1の抗体またはレセプターによって結合され、その後第2の抗体がアナライトに結合し、その結果不溶性の3部分のコンプレックスを形成する。デービッドおよびグリーン (Greene) 、米国特許第4,376,110号。第2の抗体またはレセプターはそれ自体検出可能部分で標識されている（直接的サンドイッチアッセイ）か検出可能部分で標識されている抗免疫グロブリン抗体（間接的サンドイッチアッセイ）を使用して測定することができる。例えば、サンドイッチアッセイの1つのタイプはELISAアッセイであり、その場合には、検出可能部分は酵素である。

本願明細書の抗体またはレセプターはインビボ画像化にも有用であり、その際検出可能部分で標識された抗体またはhVEGFrは患者に、好ましくは血流に直接投与され、患者内の標識抗体またはレセプターの存在および位置がアッセイされる。この画像化技術は、例えば、新生物の段階付けおよび治療に有用である。抗体またはhVEGFrは哺乳動物では核磁気共鳴か、放射学か、それとも当該技術分野で知られている他の検出手段による検出可能部分で標識される。

hVEGFのアンタゴニスト改変体

本願明細書に記載した抗体に加えて、hVEGFの他の有用なアンタゴニストには、hVEGFレセプターと結合するが天然hVEGFの生物学的活性を示さない天然hVEGFのフラグメントおよびアミノ酸配列改変体が含まれる。例えば、このようなアンタゴニストには、hVEGFのレセプター結合ドメインを含むが生物学的活性を与えるドメインを欠いているかまたはそうでない場合、細胞hVEGFレセプターの活性化が不完全なフラグメントおよびアミノ酸配列改変体、例えば、細胞hVEGFレセプターの凝集または活性化誘発能力を欠いているフラグメントまたはアミノ酸配列改変体の場合が含まれる。用語「レセプター結合ドメイン」は、hVEGFレセプター結合に係わるhVEGF中のアミノ酸配列を呼称する。用語「生物学的活性ドメイン」または「生物学的活性付与ドメイン」は、細胞分裂誘起活性または脈管形成活性のような因子のうちの特別の生物学的活性を与えるhVEGF中のアミノ酸配列を呼称する。

hVEGFが細胞表面上の2つまたはそれより多いhVEGFr分子とコンプレックスを形成できるように思われるという観察は、hVEGFがhVEGFrと結合する少なくとも2つの別個の部位を有しており、成長ホルモン、プロラクチン等の態様で活性化が生起する前に、hVEGFは連続的態様、即ち先ず1つの部位でそしてその後他の部位で上記細胞レセプターと結合することを示唆している（例えば、カニングハム (Cunningham) 等、Science 264:821 (1991年) ; ディブオス (deVos) 等、Science 255:306 (1992年) ; フー (Fuh) 等、Science 256:1677 (1992年)）。従って、hVEGFの1つのレセプター結合部位（典型的にはhVEGFとhVEGFrの初期結合に係わっている部位）が修飾されないで残っており（または修飾されている場合、結合を高めるようにならえられている）、一方hVEGFの第2の結合部位が典型的には、該結合部位を無効にするために、非保存的アミノ酸残基置換または欠失で修飾されているhVEGFのアンタゴニスト改変体が選択される。

hVEGF中のレセプター結合ドメインおよびhVEGFr中のhVEGF結合ドメインはX線試験、突然変異分析および抗体結合試験を含む当該技術分野で既知の方法によって測定される。突然変異方法には、逸脱突然変異体の選択と組み合わせた無作為飽和突然変異誘発および挿入突然変異誘発の技術が含まれる。リガンド内のレセプター結合ドメインの同定に適する他の方法はアラニン (Ala) スキヤンニング突然変異誘発として知られている。カニングハム等、Science 244, 1081～1085 (1985年)。この方法は、荷電アミノ酸側鎖を含有する領域の同定に係わっている。同定された各領域中の荷電残基（即ち、Arg、Asp、His、LysおよびGlu）はAlaで置換され（突然変異体1分子当たり1つの領域）、得られたリガンドのレセプター結合を試験して、レセプター結合における特別の領域の重要性を評価する。レセプター結合ドメインの位置

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3398382号
(P3398382)

(45)発行日 平成15年4月21日(2003.4.21)

(24)登録日 平成15年2月14日(2003.2.14)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 0 7 K 16/28

C 0 7 K 16/28

A 6 1 K 39/395

A 6 1 K 39/395

T

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/00

C 1 2 N 15/02

C 1 2 P 21/02

C

15/09

21/08

請求項の数11(全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平6-510999

(73)特許権者 99999999

ジェネンテク、インコーポレイテッド

(86) (22)出願日

平成4年10月28日(1992.10.28)

アメリカ合衆国、カリフォルニア

(65)公表番号

特表平8-502514

94080-4990、サウス・サンフランシス

(43)公表日

平成8年3月19日(1996.3.19)

コ、ディーエヌエイ・ウェイ 1

(86)国際出願番号

P C T / U S 9 2 / 0 9 2 1 8

(72)発明者

フェララ、ナボレオン

(87)国際公開番号

W O 9 4 / 0 1 0 2 0 2

アメリカ合衆国カリフォルニア94123、

(87)国際公開日

平成6年5月11日(1994.5.11)

サン・フランシスコ、ナンバー306、ス

審査請求日

平成11年10月25日(1999.10.25)

コット3835番

(72)発明者

キム、ウン・ジン

アメリカ合衆国カリフォルニア94112、

サン・フランシスコ、イーストウッド・

ドライブ94番

(74)代理人

99999999

弁理士 青山 葵 (外1名)

審査官 富永 みどり

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血管内皮細胞増殖因子アンタゴニスト

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】抗体であるhVEGFアンタゴニストを治療有効量含有する、癌を治療するための組成物。

より腫瘍サイズを減少させる、請求項5または6に記載の組成物。

【請求項2】抗体が抗hVEGF抗体である、請求項1に記載の組成物。

【請求項8】抗体が細胞毒性部分に結合している、請求項1~7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項3】抗体がモノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項9】細胞毒性部分がタンパク質細胞毒素またはモノクローナル抗体のFcドメインである、請求項8に記載の組成物。

【請求項4】抗体がヒト型化されている、請求項1~3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項10】他の癌の治療剤と、連続的にまたは同時に投与されるように処方される、請求項1~9のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項5】抗体が腫瘍サイズを減少させるのに充分な量で用いられる、請求項1~4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項11】放射線学的治療に対して、連続的にまたは同時に投与されるように処方される、請求項1~10のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】腫瘍が固形悪性腫瘍である、請求項5に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【請求項7】抗体がVEGF介在脈管形成を阻止することに

発明の分野

本願発明は、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）アンタゴニスト、該アンタゴニストを含む治療用組成物並びに診断および治療目的に該アンタゴニストを使用する方法に関するものである。

発明の背景

脈管系の2つの主要な細胞成分は内皮細胞と平滑筋細胞である。内皮細胞は全血管の内部表面の内張りを形成し、血液と組織の間の非凝塊形成性界面を構成する。加えて、内皮細胞は新しい毛細血管や血管の発育の重要な成分である。それ故、内皮細胞は腫瘍増殖および転移並びに種々の非新生物疾病または疾患に関連して、脈管形成または新血管形成中に増殖する。

天然に生じる種々のポリペプチドは内皮細胞の増殖を誘発することが報告されている。これらのポリペプチドには、塩基性および酸性の纖維芽細胞増殖因子（FGF）、ブルグス（Burgess）およびマシアグ（Maciag）、*Annual Rev. Biochem.*、58:575 (1989年)、血小板由来内皮細胞増殖因子（PD-ECGF）、イシカワ（Ishikawa）等、*Nature*、338:557 (1989年)、並びに血管内皮増殖因子（VEGF）、リュング（Leung）等、*Science*246:1306 (1989年)；フェララ（Ferrara）およびヘンゼル（Henzel）、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161:851 (1989年)；ティッシャー（Tescher）等、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:1198 (1989年)；フェララ等、PCT公開特許第W090/13649号(1990年11月15日公開)；フェララ等、米国特許出願第07/360,229号がある。

VEGFは最初、ウシ下垂体小胞または星状小胞細胞で条件づけた培地中で同定された。生化学分析によって、ウシVEGFは二量体タンパク質であって、見かけ上の分子量は約45,000ダルトンであり、血管内皮細胞に対して明白な細胞分裂誘発性特異を有していることが示される。ウシVEGFをコードするDNAは、ハイブリッド形成プローブとしてタンパク質のアミノ末端アミノ酸配列に基づくオリゴヌクレオチドを使用して上記細胞から調製したcDNAライブラリーをスクリーニングして単離された。

ヒトVEGFは、ウシVEGF cDNAをハイブリッド形成プローブとして使用して、ヒト細胞から調製したcDNAライブラリーを先ずスクリーニングして得られた。こうして同定された1つのcDNAは、ウシVEGFと95%以上の相同性を有する165アミノ酸のタンパク質をコードしており、このタンパク質はヒトVEGF（hVEGF）と称されている。ヒトVEGFの細胞分裂誘起性は、哺乳動物宿主細胞中でヒトVEGF cDNAを発現することによって確認された。ヒトVEGF cDNAでトランスフェクションした細胞で条件づけた培地は毛細血管内皮細胞の増殖を促進したが、一方対照細胞では促進しなかった。リュング等、*Science*246:1306 (1989年)。

更に幾つかのcDNAが、hVEGFは121-、189-および206-アミノ酸イソ形態をコードするヒトcDNAライブリー中に同定された。121-アミノ酸タンパク質は、hVEGFの残

基116から159の間の44個のアミノ酸を欠失しているためhVEGFと異なっている。189-アミノ酸タンパク質は、hVEGFの残基116に24個のアミノ酸挿入があるためhVEGFと異なっており、明らかにヒト血管透過性因子（hVPF）と同一である。206-アミノ酸タンパク質は、hVEGFの残基116に41個のアミノ酸の挿入があるためhVEGFと異なっている。フック（Houck）等、*Mol. Endocrin.* 5:1806 (1991年)；フェララ等、*J. Cell. Biochem.* 47:211 (1991年)；フェララ等、*Endocrine Reviews* 13:18 (1992年)；ケック（Keck）等、*Science* 246:1309 (1989年)；コノリ（Connolly）等、*J. Biol. Chem.* 264:20017 (1989年)；ケック等、EPO公開特許第0 370 989号(1990年5月30日公開)。

VEGFは血管内皮細胞増殖を刺激するだけでなく、血管透過性および脈管形成も誘発する。以前から存在する内皮から新しい血管の形成に係わっている脈管形成は、腫瘍増殖および転移、リウマトイド関節炎、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜性、後水晶体纖維増殖症、血管新生性線内障、血管腫、移植した角膜組織や他の組織の免疫拒絶並びに慢性炎症を含む多種の疾病や疾患の重要な成分である。

腫瘍増殖の場合には、脈管形成が過形成から新生物形成への変移および増殖中の固形腫瘍への栄養供給に決定的に重要であるように思われる。フォークマン（Folkman）等、*Nature* 339:58 (1989年)。また、脈管形成は腫瘍と宿主の血管床の接触を可能にし、この血管床が腫瘍細部の転移経路を提供すると思われる。腫瘍転移における脈管形成の役割の証拠は、例えば、侵入性ヒト乳癌の組織学的切片中の微小血管の数および密度と実際の遠位転移の存在との間の関係を示す研究によって提供されている。ワイドナー（Weidner）等、*New Engl. J. Med.* 324:1 (1991年)。

血管内皮細胞増殖および脈管形成の役割並びに多数の疾病や疾患におけるこれらの過程を考慮して、VEGFの1つまたはそれより多い生物学的効果を減少させるかまたは阻止する手段を有することが望ましい。正常状態および病理学的状態、特に癌でのVEGFの存在をアッセイする手段を有することも望ましい。

発明の要約

本願発明はVEGFのアンタゴニストを提供し、これらには(a) hVEGF、hVEGFレセプター、またはhVEGFレセプターと会合したhVEGFを含むコンプレックスと特異的に結合できる抗体およびそれらの変形体、(b) hVEGFレセプターおよびそれらの変形体、並びに(c) hVEGFの変形体が含まれる。これらのアンタゴニストはhVEGFの細胞分裂活性、脈管形成活性または他の生物学的活性を阻止するので、望ましくない過度の血管新生を特徴とする疾病または疾患の治療に有用であり、これらの例としては腫瘍、そして特に固形悪性腫瘍、リウマトイド関節炎、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他

の網膜症、後水晶体纖維増殖症、血管新生性緑内障、血管腫、甲状腺過形成（バセドウ病を含む）、角膜および他の組織の移植、並びに慢性炎症が含まれる。また、これらのアンタゴニストは望ましくない過度の血管透過性、例えば、脳腫瘍に関連した浮腫、悪性物に関連した腹水、メーグス症候群、肺炎症、ネフローゼ症候群、心膜滲出液（例えば、心膜炎に関連するもの）、並びに胸膜滲出液を特徴とする疾患または疾患の治療にも有用である。

他の特徴としては、VEGFアンタゴニストは、(a) 非hVEGFエピトープ、例えば、血栓形成若しくは血栓溶解に係わるタンパク質のエピトープ、または腫瘍細胞表面抗原、および(b) hVEGF、hVEGFレセプターまたはhVEGFレセプターと会合したhVEGFを含むコンプレックスと結合し得る多特異性モノクローナル抗体である。

更に他の特徴としては、VEGFアンタゴニストは細胞毒性部分と抱合体を形成する。

もう1つの特徴としては、本発明は、上記したようなモノクローナル抗体をコードする単離核酸およびこのようなモノクローナル抗体を产生するハイブリドーマ細胞株に関するものである。

もう1つの特徴としては、本発明は、哺乳動物のhVEGF介在細胞分裂活性または脈管形成活性を減少させるかまたは消失させるのに有効な量のVEGFアンタゴニストを含む製薬組成物に関するものである。

別の特徴としては、本発明は、哺乳動物、好ましくは治療を必要としているヒト患者に生理学的に有効量のVEGFアンタゴニストを投与することを含む治療方法に関するものである。所望の場合、VEGFアンタゴニストは1つまたはそれより多い他のVEGFアンタゴニストまたは抗腫瘍若しくは抗脈管形成物質と同時に、または順次投与する。

もう1つの特徴としては、本発明は、hVEGFと特異的に結合し、このような結合の程度を測定し得る抗体と試験試料を接触させることによって試験試料中のhVEGFを検出する方法に関するものである。

図面の簡単な説明

図1は、抗hVEGFモノクローナル抗体とhVEGFとの結合に与える抗hVEGFモノクローナル抗体（A4.6.1またはB2.6.2）または無関係の抗肝細胞増殖因子抗体（抗-HGF）の効果を示すものである。

図2は、ウシ副腎皮質毛細血管内皮（ACE）細胞培養物中のhVEGFの生物学的活性に与える抗hVEGFモノクローナル抗体（A4.6.1またはB2.6.2）または無関係の抗-HGF抗体の効果を示すものである。

図3は、hVEGFとウシACE細胞の結合に与える抗hVEGFモノクローナル抗体（A4.6.1、B2.6.2またはA2.6.1）の効果を示すものである。

図4は、マウスにおけるNEG55腫瘍増殖の増殖速度に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体処置の効果を

示すものである。

図5は、処置から5週間後のマウスにおけるNEG55腫瘍の大きさに与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体処置の効果を示すものである。

図6は、マウスにおけるSK-LMS-1腫瘍の増殖に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体（VEGF Ab）処置の効果を示すものである。

図7は、マウスにおけるA673腫瘍の増殖に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体（VEGF Ab）処置の種々の投与量の効果を示すものである。…は…に示す。
(SIC; is shown in)

図8は、培養物中のNEG55（G55）膠芽腫細胞の増殖および生存に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体の効果を示すものである。

図9は、培養物中のA673横紋筋肉腫細胞の増殖および生存に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体の効果を示すものである。

図10は、ヒト内皮細胞のヒト滑液誘発走化性に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体の効果を示すものである。

発明の詳細な説明

本願明細書で使用する、用語「hVEGF」は、リュング等、Science246:1306 (1989年) およびフック等、Mol. Endocrin. 5:1806 (1991年) が記載したような165-アミノ酸ヒト血管内皮細胞増殖因子並びに関連のある121-、189-および206-アミノ酸血管内皮細胞増殖因子と、これら増殖因子の天然生起の対立遺伝子体および処理体を呼称する。

本願発明は、hVEGFの1つまたはそれより多い生物学的活性、例えば、その細胞分裂誘起活性または脈管形成活性を阻止し得るhVEGFのアンタゴニストを提供する。hVEGFのアンタゴニストは、hVEGFと細胞レセプターの結合を妨げ、hVEGFによって活性化されている細胞を無能力化若しくは殺害し、またはhVEGFと細胞レセプターの結合後に血管内皮細胞活性化を妨げることによって作用する。hVEGFアンタゴニストによる干渉の要点は全て、本願発明の目的では等価であると考えるべきである。それ故、hVEGF、hVEGFレセプターまたはhVEGFレセプターと会合したhVEGFを含むコンプレックスと結合する抗体、そして好ましくはモノクローナル抗体、またはそれらのフラグメントが本発明の範囲内に含まれる。更に、hVEGFレセプターと結合するが天然hVEGFの生物学的活性を示さないhVEGFのフラグメントおよびアミノ酸改変体も本発明の範囲内に含まれる。更に、hVEGFを結合し得るhVEGFレセプター並びにそれらのフラグメントおよびアミノ酸配列改変体も本発明の範囲内に含まれる。

本願明細書で使用する、用語「hVEGFレセプター」または「hVEGFr」はhVEGFの細胞レセプター、通常は血管内皮細胞に見られる細胞表面レセプター、並びにhVEGF

を結合する能力を保持しているそれらの改変体を呼称する。典型的には、hVEGFアンタゴニストであるhVEGFレセプターおよびそれらの改変体は、天然での場合のように細胞膜中に組み入れられるかまたは細胞表面に固定されているというよりむしろ単離された形態である。hVEGFレセプターの1つの例はfms様チロシンキナーゼ(flt)、即ちチロシンキナーゼ属のトランスメンブランレセプターである。デブリーズ(DeVries)等、*Science* 255:989 (1992年) ; シブヤ(Shibuya)等、*Oncogene* 5:519 (1990年)。fltレセプターには細胞外ドメイン、トランスメンブランドメインおよび細胞内ドメインが含まれ、チロシンキナーゼ活性を有している。細胞外ドメインはhVEGFの結合に係わっており、一方細胞内ドメインはシグナル導入に係わっている。

hVEGFレセプターのもう1つの例はflk-1レセプター(KDRとも称される)である。マシューズ(Matthews)等、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:9026 (1991年) ; ターマン(Terman)等、*Oncogene* 6:1677 (1991年) ; ターマン等、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1579 (1992年)。

hVEGFとfltレセプターの結合によって、見かけ上の分子量が205,000と300,000ダルトンである少なくとも2つの高分子量コンプレックスが形成される。300,000ダルトンのコンプレックスはhVEGF1分子にレセプター2分子が結合したものを含む二量体であると考えられる。

hVEGFrの改変体も本願明細書の範囲内に含まれる。代表的な例には、トランスメンブランおよび細胞質ドメインがレセプターから欠失しているレセプターの切断された形態、および非hVEGFrポリマーまたはポリペプチドがhVEGFrと抱合している融合タンパク質、または好ましくはそれらの切断された形態が含まれる。このような非hVEGFポリペプチドの例は免疫グロブリンである。その場合には、例えば、hVEGFrの細胞外ドメインは免疫グロブリンIまたは(好ましくは)H鎖のFvドメインと置換しており、レセプターの細胞外ドメインのC末端はH鎖のCH1、ヒンジ、CH2または他のフラグメントのアミノ末端と共有結合している。このような改変体は既知の免疫付着と同じ形態で製造される。例えば、ガスコイン(Gascogne)等、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:2936 (1987年) ; カポン(Capon)等、*Nature* 337:525 (1989年) ; アルフオ(Aruffo)等、*Cell* 61:1303 (1990年) ; アッシュケナジ(Ashkenazi)等、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:10535 (1991年) ; ベネット(Bennett)等、*J. Biol. Chem.* 266:23060 (1991年) 参照。他の実施態様では、hVEGFrは、ポリエチレンリコール(PEG)のような非タンパク性ポリマー(例えば、デービス(Davis)等、英国特許第4,179,337号; グッドソン(Goodson)等、*BioTechnology* 8:343~346 (1990年) ; アバチョウスキイ(Abuchowski)等、*J. Biol. Chem.* 252:3578 (1977年) ; アバチョウスキイ等、*J. Biol. Chem.* 252:3582 (1977年) 参照)また

は炭水化物(例えば、マーシャル(Marshall)等、*Arc h. Biochem. Biophys.* 167:77 (1975年) 参照)と抱合している。これは、hVEGFrの生物学的半減期を延長し、レセプターが投与される哺乳動物で免疫原性である可能性を減少させるのに役立つ。hVEGFrは、アンタゴニストの親和性およびhVEGFに対するその原子価を考慮して、hVEGFの抗体と実質的に同じ形態で使用される。

hVEGFレセプター自体または免疫グロブリンポリペプチド若しくは他の担体ポリペプチドと融合したhVEGFレセプターの細胞外ドメインは、宿主中に存在しているが細胞表面のhVEGFrと結合していないhVEGFを隔離する能力によって、hVEGFのアンタゴニストとして特に有用である。

hVEGFrとその改変体は、hVEGFのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するスクリーニングアッセイにも有用である。例えば、hVEGFr(例えば、fltまたはflk1)をコードするDNAでトランスフェクションされた宿主細胞は細胞表面でレセプターポリペプチドを過剰発現し、このような組換え体宿主細胞は試験化合物(例えば、小分子、線状若しくは環状ペプチドまたはポリペプチド)のhVEGFrとの結合能の分析に理想的に適合させられる。hVEGFrおよびhVEGFr融合タンパク質、例えばhVEGFr-IgG融合タンパク質は類似の形態で使用することができる。例えば、融合タンパク質を固定支持体に結合させ、試験化合物が融合タンパク質のhVEGFrドメインから放射標識hVEGFを追い出す能力を測定する。

hVEGF、hVEGFレセプター、モノクローナル抗体または他のタンパク質に関して使用される用語「組換え体」は、宿主細胞中で組換え体DNA発現によって產生されるタンパク質を呼称する。宿主細胞は原核細胞(例えば、大腸菌のような細菌細胞)または真核細胞(例えば、酵母または哺乳動物細胞)でありうる。

アンタゴニストモノクローナル抗体

本願明細書で使用する、用語「モノクローナル抗体」は実質的に同種の抗体集団から得られる抗体、即ち、少量で存在することがある天然生起の突然変異を除いて、特異性および親和性が同一の集団を構成する個々の抗体を呼称する。上記の天然生起の突然変異等の結果として、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGFrと会合したhVEGFを含むコンプレックス(「hVEGF-hVEGFrコンプレックス」)と特異的に結合し得る抗体を主として含有する本発明のモノクローナル抗体組成物は少量の他の抗体も含有する可能性があることを認めなければならない。

それ故、修飾語「モノクローナル」は、このような実質的に同種の抗体集団から得られるような抗体の特徴を示すものであって、何か特別の方法で抗体が产生されることを要求していると考えるべきでない。例えば、本発明のモノクローナル抗体は、最初にコーラー(Kohler)およびミルステイン(Milstein)、*Nature* 256:495 (1975年)が記載したハイブリドーマ方法を使用して製造す

ることができ、または組換えDNA方法によって製造することができる。カビリ (Cabilly) 等、米国特許第4,816,567号。

ハイブリドーマ方法では、マウスまたは他の適当な宿主動物を皮下、腹腔内、または筋肉内経路で抗原を用いて免疫化して、免疫化に使用されたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生するかまたは産生し得るリンパ球を誘引する。或いは、リンパ球をインビトロで免疫化することができる。次に、リンパ球はポリエチレングリコールのような適当な融合剤を使用してミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を形成させる。ゴーディング (Goding) のモノクローナル抗体：原理および実施、59～103頁 (Academic Press, 1986年)。

抗原はhVEGF、hVEGFr、またはhVEGF-hVEGFrコンプレックスであることがある。抗原は任意に、hVEGFとそのレセプターの1つとの結合に関与する1つまたはそれより多いアミノ酸残基を有するhVEGFまたはhVEGFrのいずれか1つのフラグメントまたは部分である。例えば、hVEGFrの細胞外ドメイン（即ち、トランスメンブランおよび細胞内ドメインを欠失している切断hVEGFrポリペプチド）による免疫化は、hVEGF結合に係わっているのは細胞外ドメインであるので、hVEGFのアンタゴニストである抗体を産生するのに特に有用である。

hVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合し得るモノクローナル抗体は、特に、それらが非会合（コンプレックス化されていない）hVEGFおよびhVEGFrにも結合しない場合、有用である。それ故、このような抗体はhVEGFによって直接的な活性化を受けている細胞とだけ結合し、従って哺乳動物中に通常見られる遊離hVEGFまたはhVEGFrでは結合されない。このような抗体は典型的には、レセプターとhVEGF間の1つまたはそれ以上の接触点に及びエピトープと結合する。このような抗体は他のリガンドレセプターコンプレックスに対して産生されており、ここで同じ様で産生させることができる。これらの抗体は、抗体が非会合hVEGFまたはhVEGFrと結合し得るか否かに拘わらず、非会合hVEGF若しくはhVEGFrの生物学的活性を無効化または阻止する必要はなく、無効化または阻止することもできない。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞は、融合していない親ミエローマ細胞の増殖または生存を阻止する1つまたはそれより多い物質を好ましくは含有する適当な培養培地に接種し、増殖させる。例えば、親ミエローマ細胞が酵素ヒボキサンチン グアニン ホスホリボシル トランスフェラーゼ (HGPRTまたはHPRT) を欠いている場合、ハイブリドーマ用の培養培地は典型的にはヒボキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含有し (HAT培地) 、これら物質はHGPRT欠損細胞の増殖を阻止する。

好ましいミエローマ細胞は効率的に融合する細胞であり、選択した抗体産生細胞による抗体の安定した高レベ

ル発現を支持し、HAT培地のような培地に感受性である。これらのなかで、好ましいミエローマ細胞株はネズミミエローマ株、例えば、米国カリフォルニア州サンジエゴのサーク インスチチュート セル ディストリビューションセンター (Salk Institute Cell Distribution Center) から入手できるMOPC-21およびMOPC-11マウス腫瘍、米国メリーランド州ロックビルの米国菌培養収集所 (ATCC) から入手できるSP-2細胞、およびエルトン (Yelton) 等がCurr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 1 (1978年) に記載したP3X63Ag8U.1細胞から誘導されるものである。ヒトミエローマおよびマウスヒトヘテロミエローマ細胞株もヒトモノクローナル抗体の产生に関して記載されている。コズボル (Kozbor) 、J. Immunol. 133:3001 (1984年) 。プロデュア (Brodeur) 等のモノクローナル抗体産生技術および応用、51～63頁 (Marcel Dekker, Inc. ニューヨーク、1987年)。

ハイブリドーマ細胞が増殖している培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の产生についてアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって產生されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降法またはインビトロ結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ (RIA) または酵素結合免疫吸着剤アッセイ (ELISA) によって測定する。本発明のモノクローナル抗体は、hVEGF、hVEGFr若しくはhVEGF-hVEGFrコンプレックスを優先的に免疫沈降させるかまたは結合アッセイで上記抗原の少なくとも1つと優先的に結合し、hVEGFの生物学的活性を阻止し得るものである。

ハイブリドーマ細胞が所望の特異性、親和性および活性のアンタゴニスト抗体を産生することを確認した後、クローンは限界希釈法でサブクローン化し、標準方法で増殖させることができる。ゴーディングのモノクローナル抗体：原理および実施、59～104頁 (Academic Press, 1986年)。この目的に適する培養培地には、例えば、ダルベッコの修正イーグル培地またはRPMI-1640培地が含まれる。更に、ハイブリドーマ細胞は動物の腹水腫瘍としてインビトロで増殖させることができる。

サブクローンが分泌したモノクローナル抗体は、例えば、タンパク質A-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティクロマトグラフィーのような慣用の免疫グロブリン精製方法を使用して培養培地、腹水または血清から適切に分離される。

本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは容易に単離されそして慣用の方法を使用して（例えば、ネズミ抗体のHおよびL鎖をコードする遺伝子と特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用して）配列が決定される。本発明のハイブリドーマ細胞はこのようなDNAの好ましい供給源として役立つ。一度単離されると、DNAを発現ベクターに入れ、次にこれをシミアンCHO細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞また

はミエローマ細胞のような宿主細胞中にトランスフェクションして組換え体宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成を得る。上記細胞はトランスフェクションしない場合、免疫グロブリンタンパク質を産生しない。

[DNAの] 発現によって産生される免疫グロブリンの特徴を変えるために、DNAは任意に修飾することができる。例えば、ネズミ抗体のヒト型化形態は、ネズミ抗体可変部の相補性決定領域(CDR)でヒト抗体の対応する領域を置換することによって産生される。或る実施態様では、ネズミ抗体の選択された枠組み領域(FR)アミノ酸残基でもヒト抗体中の対応するアミノ酸残基を置換する。カーター(Carter)等、Proc. Nat. Acad. Sci. 89:4285(1992年);カーター等、BioTechnology 10:163(1992年)。ネズミ抗体のキメラ形態も、選択したヒトHおよびL鎖不变部のコード化配列を同種ネズミ配列の適所に置換して産生される。カビリ等、米国特許第4,816,567号;モリソン(Morrison)等、Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851(1984年)。

本発明の範囲内に含まれる抗体には、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックス並びに非hVEGFエピトープと結合し得る免疫グロブリン鎖を有するキメラ(「ヒト型化」を含む)抗体およびハイブリッド抗体のような改変体抗体が含まれる。

本願明細書の抗体には、全ての起源種、並びに免疫グロブリンクラス(例えば、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM)およびサブクラス、並びに抗体フラグメント(例えば、Fab、F(ab')2およびFv)は、これらがhVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合可能であり、hVEGFの生物学的活性と拮抗し得る限り、これらが含まれる。

本発明の好ましい実施態様では、モノクローナル抗体は、例えば、ムンソン(Munson)およびポラード(Pollard)、Anal. Biochem. 107:220(1980年)のスカッチャード分析によって測定するとき、免疫化抗原に対して少なくとも約10⁹リットル[sic;liters]/モルの親和性を有する。更に、モノクローナル抗体は典型的には、例えば、実施例2に記載するようなインビトロ細胞生存または増殖アッセイによって測定するとき、hVEGFの細胞分裂誘起性活性または脈管形成活性を少なくとも約50%、好ましくは80%以上、そして最も好ましくは90%以上阻止する。

或る治療的および診断的適用では、モノクローナル抗体がhVEGFの種々の分子形態の全てとは反応性でないことが望ましい。例えば、165-アミノ酸配列hVEGFとは特異的に結合できるが121-または189-アミノ酸配列hVEGFポリペプチドとは結合しないモノクローナル抗体を有することが望ましい。このような抗体は種々のhVEGFポリペプチドの比較ELISAアッセイまたは比較免疫沈降法によって容易に同定される。

細胞毒性部分との抱合体

或る実施態様では、hVEGF特異性のモノクローナル抗体またはhVEGFrと抱合した細胞毒性部分を提供することが望ましい。これらの実施態様では、細胞毒素はhVEGF若しくはそのレセプターを発現または結合している細胞を無効化するかまたは殺害するのに役立つ。hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合し得るドメインによって抱合体を細胞に対して標的化させる。かくして、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合できるモノクローナル抗体を細胞毒素と抱合させる。同様に、hVEGFrを細胞毒素と抱合させる。モノクローナル抗体は最も望ましくは、hVEGF単独(細胞毒素を有していない)の活性を無効化できるが、この実施態様ではモノクローナル抗体またはレセプターがhVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスとまで結合できる必要はない。

或るクラスの免疫グロブリンの或るクラスの場合には、モノクローナル抗体自体のFcドメインが細胞毒素を提供するのに役立つことがある(例えばIgG2抗体の場合には、該抗体は補体を固定し、抗体依存性細胞毒性(ADCC)に関与することができる)が、典型的には、細胞毒素はタンパク質細胞毒素、例えばジフテリア、リシンまたはシードモナス毒素である。しかし乍ら、細胞毒素はタンパク質である必要はなく、例えば腫瘍治療用にこれまでに使用された化学療法剤を含めることができる。

細胞毒素は典型的には、抗体のFcドメイン内で(または[Fcドメインの]1部若しくは全ての適所で)バックボーンアミド結合によってモノクローナル抗体またはそのフラグメントと結合する。標的化機能がhVEGFrによって供給される場合、細胞毒性部分はhVEGF結合に関与しないレセプターの任意のドメイン上に置換され;好ましくは、該部分はレセプターのトランスメンブランおよび/または細胞質ドメインの代わりまたは該ドメイン上に置換される。最適の置換部位は定型的な実験によって決定され、十分通常の技量の範囲内である。

タンパク質融合体である抱合体は、抱合体をコードする遺伝子を発現させることによって組換え細胞培養物中で容易に製造される。或いは、抱合体は、例えば、イミノチオレートやメチル-4-メルカプトブチルマダートを使用して、チオエステル結合によるジスルフィド交換または結合のような自体既知の方法を使用して、細胞毒性部分を抗体またはレセプターのアミノ酸残基側鎖またはC末端カルボキシルに共有序に交差結合させて製造される。

他の部分との抱合体

hVEGFのアンタゴニストであるモノクローナル抗体およびhVEGFrも、それら自体では細胞毒素として容易には分類されないが本願明細書の組成物の活性を増す物質と抱合する。例えば、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合し得るモノクローナル抗体またはhVEGFrは、ウイルス配列のような異種ポリペプチド、細

胞レセプター、TNF、インターフェロンまたはインテロイキンのようなサイトカイン、凝血促進活性を有するポリペプチドおよび他の生物学的または免疫学的に活性のポリペプチドと融合する。このような融合体は組換え体方法によって容易に製造される。典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドで抗hVEGF若しくは抗hVEGF-hVEGFrコンプレックス抗体の不变ドメイン、またはhVEGFrのトランスメンブランおよび/または細胞内ドメインを置換する。或いは、上記ポリペプチドで、本願明細書に記載した抗hVEGF抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインを置換する。

好ましい実施態様では、このような非免疫グロブリンポリペプチドは本願明細書に記載した抗体の不变ドメインと結合されるかまたはそれらに置き換わる。ベネット等、*J. Biol. Chem.* 266:23060~23067 (1991年)。或いは、上記ポリペプチドで本願明細書の抗体のFvを置換し、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスに対して特異性を有する少なくとも1つの残存抗原結合部位および出発抗体とは異なる機能または特異性を有する代用抗原結合部位を含むキメラ多価抗体が創製される。

異種特異性抗体

hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合し得るモノクローナル抗体は、列挙したエピトープ、典型的には1つのH-L鎖コンプレックスまたはそのフラグメントに対して1つの結合部位を有してさえいれば良い。しかし乍ら、このような抗体は任意に、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスのいずれの内部にも見られないエピトープと結合し得る抗原結合ドメインも有している。例えば、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックス以外の抗原に対して特異性を有する抗体の相補性決定残基および、必要な場合、枠組み残基を有する、天然の抗hVEGF、抗hVEGFrまたは抗hVEGF-抗hVEGFrコンプレックス抗体の対応するアミノ酸配列またはアミノ酸残基で置換することによって、hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスに特異性を有する1つの抗原結合部位および非hVEGF、hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックス抗原に特異性を有するもう1つの抗原結合部位を含む多特異的抗体が創製される。これらの抗体は少なくとも二価であるが、選択した抗体クラスによって所有される抗原結合部位数に従って、多価であることもできる。例えば、IgMクラスの抗体は多価である。

本発明の好ましい実施態様では、上記の抗体はhVEGFまたはhVEGFrエピトープと、(a) タンパク質C若しくは組織因子のような血液凝固に活性のポリペプチド、(b) 肿瘍壞死因子(TNF)のような細胞毒性タンパク質、または(c) CD4若しくはHER-2レセプターのような非hVEGFr細胞表面レセプターのいずれかと結合することができる(Maddon等、*Cell* 42:93 (1985)

年)；コーセンス(Coussens)等、*Science* 230:1137 (1985年)。異種特異性の多価抗体は宿主細胞と両抗体のHおよびL鎖をコードするDNAを共形質転換させ、その後免疫アフィニティークロマトグラフィ等によって回収して都合よく製造され、発現された抗体の部分は所望の抗原結合特性を有している。或いは、このような抗体はモノ特異性抗体のインビトロ組換えによって製造される。

一価抗体

hVEGFrまたはhVEGF-hVEGFrコンプレックスと結合し得る一価抗体はhVEGFのアンタゴニストとして特に有用である。本発明は生物学的活性のどの特別のメカニズムにも限定されることなく、細胞hVEGFレセプターの活性化は、hVEGFと細胞hVEGFレセプターとの結合がレセプターの凝固を誘発し、順次細胞内レセプターキナーゼ活性を活性化するというメカニズムで進行すると考えられる。一価の抗hVEGFレセプター抗体はこのような凝固を誘発できず、それ故上記メカニズムによってhVEGFレセプターを活性化できないので、上記抗体はhVEGFの理想的なアンタゴニストである。

しかし乍ら、これらの抗体はレセプターのhVEGF結合部位を指向するかまたはそうでない場合hVEGFレセプターと結合するhVEGFを、例えばレセプターに対するhVEGFの接近を立体的に障害することによって、妨げることが可能でなければならないことに注意すべきである。しかし乍ら、本願明細書の他の場所で記載したように、hVEGFの結合を妨げることができない抗hVEGFr抗体は、非免疫グロブリン部分、例えば細胞毒素と抱合したとき有用である。

一価抗体の製造方法は当該技術分野で良く知られている。例えば、1つの方法は免疫グロブリンL鎖および修飾したH鎖の組換え体発現に係わるものである。H鎖は一般に、H鎖架橋を防止するように、Fc領域の任意の点で切断される。或いは、関連システィン残基は、架橋を防止するようにもう1つのアミノ酸残基で置換されるかまたは欠失される。インビトロ方法も、一価抗体の製造に適している。例えば、Fabフラグメントは無傷抗体の酵素開裂によって製造される。

診断用途

診断適用では、本発明の抗体またはhVEGFrは典型的には検出可能部分で標識される。検出可能部分は、検出可能シグナルを直接的にまたは間接的に作ることができる任意のものであることができる。例えば、検出可能部分は、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S若しくは¹²⁵Iのような放射性同位元素、蛍光イソチオシアネート、ローダミン若しくはルシフェリンのような蛍光または化学ルミネセンス化合物、例えば¹²⁵I、³²P、¹⁴C若しくは³Hのような放射性同位元素標識、またはアルカリホスファターゼ、ペーターガラクトシダーゼ若しくはホースラディッシュペルオキシダーゼのような酵素でありえる。

抗体またはhVEGFrを検出可能部分と別個に抱合させる当該技術分野で既知の任意の方法を使用することができ、これらの方法にはハンター (Hunter) 等、Nature 144:945 (1962年) ; デービッド (David) 等、Biochemistry 13:1014 (1974年) ; ペイン (Pain) 等、J. Immunology 104:219 (1981年) ; およびニグレン (Nygren) 、J. Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982年) が記載した方法が含まれる。

本願発明の抗体およびレセプターは既知の任意のアッセイ方法、例えば競合結合アッセイ、直接および間接的サンドイッチアッセイおよび免疫沈降アッセイを使用することができる。ゾラ (Zola) 、モノクローナル抗体：技術マニュアル、147～158頁 (CRC Press, Inc.、1987年) 。

競合結合アッセイは標識標準品（これはhVEGFまたはその免疫学的に反応性の部分でありえる）の一定量の抗体と結合する試験試料アナライト (analyte) (hVEGF) との競合能力に依拠している。試験試料中のhVEGF量は、抗体またはレセプターと結合されることになる標準品の量に逆比例する。結合されることになる標準品の量の測定を促進するために、抗体またはレセプターは一般に競合前後に不溶化されるので、抗体またはレセプターと結合する標準品およびアナライトは結合していない標準品およびアナライトから好都合に分離することができる。

サンドイッチアッセイは、検出すべきタンパク質の種々の免疫原性部分またはエピトープと結合し得る2つの抗体またはレセプターを使用することに係わるものである。サンドイッチアッセイでは、試験試料アナライトは固形支持体に固定されている第1の抗体またはレセプターによって結合され、その後第2の抗体がアナライトに結合し、その結果不溶性の3部分のコンプレックスを形成する。デービッドおよびグリーン (Greene) 、米国特許第4,376,110号。第2の抗体またはレセプターはそれ自体検出可能部分で標識されている（直接的サンドイッチアッセイ）か検出可能部分で標識されている抗免疫グロブリン抗体（間接的サンドイッチアッセイ）を使用して測定することができる。例えば、サンドイッチアッセイの1つのタイプはELISAアッセイであり、その場合には、検出可能部分は酵素である。

本願明細書の抗体またはレセプターはインビオ画像化にも有用であり、その際検出可能部分で標識された抗体またはhVEGFrは患者に、好ましくは血流に直接投与され、患者内の標識抗体またはレセプターの存在および位置がアッセイされる。この画像化技術は、例えば、新生物の段階付けおよび治療に有用である。抗体またはhVEGFrは哺乳動物では核磁気共鳴か、放射学か、それとも当該技術分野で知られている他の検出手段による検出可能部分で標識される。

hVEGFのアンタゴニスト改変体

本願明細書に記載した抗体に加えて、hVEGFの他の有用なアンタゴニストには、hVEGFレセプターと結合するが天然hVEGFの生物学的活性を示さない天然hVEGFのフラグメントおよびアミノ酸配列改変体が含まれる。例えば、このようなアンタゴニストには、hVEGFのレセプター結合ドメインを含むが生物学的活性を与えるドメインを欠いているかまたはそうでない場合、細胞hVEGFレセプターの活性化が不完全なフラグメントおよびアミノ酸配列改変体、例えば、細胞hVEGFレセプターの凝集または活性化誘発能力を欠いているフラグメントまたはアミノ酸配列改変体の場合が含まれる。用語「レセプター結合ドメイン」は、hVEGFレセプター結合に係わるhVEGF中のアミノ酸配列を呼称する。用語「生物学的活性ドメイン」または「生物学的活性付与ドメイン」は、細胞分裂誘起活性または脈管形成活性のような因子のうちの特別の生物学的活性を与えるhVEGF中のアミノ酸配列を呼称する。

hVEGFが細胞表面上の2つまたはそれより多いhVEGFr分子とコンプレックスを形成できるように思われるという観察は、hVEGFがhVEGFrと結合する少なくとも2つの別個の部位を有しており、成長ホルモン、プロラクチン等の態様で活性化が生起する前に、hVEGFは連続的態様、即ち先ず1つの部位でそしてその後他の部位で上記細胞レセプターと結合することを示唆している（例えば、カニングハム (Cunningham) 等、Science 264:821 (1991年) ; ディボス (deVos) 等、Science 255:306 (1992年) ; フー (Fuh) 等、Science 256:1677 (1992年) ）。従って、hVEGFの1つのレセプター結合部位（典型的にはhVEGFとhVEGFrの初期結合に係わっている部位）が修飾されないで残っており（または修飾されている場合、結合を高めるように変えられている）、一方hVEGFの第2の結合部位が典型的には、該結合部位を無効にするために、非保存的アミノ酸残基置換または欠失で修飾されているhVEGFのアンタゴニスト改変体が選択される。

hVEGF中のレセプター結合ドメインおよびhVEGFr中のhVEGF結合ドメインはX線試験、突然変異分析および抗体結合試験を含む当該技術分野で既知の方法によって測定される。突然変異方法には、逸脱突然変異体の選択と組み合わせた無作為飽和突然変異誘発および挿入突然変異誘発の技術が含まれる。リガンド内のレセプター結合ドメインの同定に適する他の方法はアラニン (Ala) スキヤンニング突然変異誘発として知られている。カニングハム等、Science 244, 1081～1085 (1985年) 。この方法は、荷電アミノ酸側鎖を含有する領域の同定に係わっている。同定された各領域中の荷電残基（即ち、Arg、Asp、His、LysおよびGlu）はAlaで置換され（突然変異体1分子当たり1つの領域）、得られたリガンドのレセプター結合を試験して、レセプター結合における特別の領域の重要性を評価する。レセプター結合ドメインの位置

を決定する更に強力な方法は抗hVEGF抗体の無効化を使用することによるものである。キム (Kim) 等、Growth Factors 7:53 (1992年)。通常、上記方法と類似方法を組み合せて、レセプター結合に関与するドメインの位置決定用に使用する。

hVEGFに関して使用される用語「アミノ酸配列改変体」は、hVEGFの天然形態のアミノ酸配列と或る程度異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを呼称する。通常、アンタゴニストアミノ酸配列改変体は天然のhVEGFの少なくとも1つのレセプター結合ドメインと少なくとも約70%の同質性を有しており、好ましくは〔天然hVEGFのレセプター結合ドメイン〕と少なくとも約80%、更に好ましくは少なくとも約90%の同質性を有している。アミノ酸配列改変体は、hVEGFレセプターと結合する能力を保持する（そしてその結果、hVEGFレセプターとの結合に関して天然hVEGFと競合する）が、内皮細胞増殖、脈管形成または血管透過性のようなhVEGFの1つまたはそれ以上の生物学的効果は誘発できないよう、天然hVEGFのアミノ酸配列内の或る位置での置換、欠失および／または挿入を有している。

「同質性」は、必要な場合には最大パーセントの同質性を達成するために配列を整列させそして間隙を導入した後に、天然hVEGFのレセプター結合ドメインのアミノ酸配列中の残基と同一であるアミノ酸配列改変体中の残基のパーセントとして定義される。整列の方法およびコンピュータープログラムは当該技術分野で良く知られている。このような1つのコンピュータープログラムは、ジェネンテック (Genentech) Inc. が著作した「Align 2」であり、これは1991年12月10日に20559ワシントンDCの米国著作権局に使用者用説明と共に提出された。置換改変体は、天然配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基を除去し、同じ位置の適所に別のアミノ酸を挿入しているものである。置換は、分子中の僅か1つのアミノ酸が置換されている単一であるか、2つ若しくはそれより多いアミノ酸が同じ分子内で置換されている複数である。

挿入改変体は天然配列の特定の位置のアミノ酸に直接隣接して挿入された1つまたはそれより多いアミノ酸を有するものである。アミノ酸に直接隣接するとは、アミノ酸のα-カルボキシまたはα-アミノ官能基のいずれかと結合することを意味する。

欠失改変体は、天然配列の1つまたはそれより多いアミノ酸残基が除去されているものである。通常、欠失改変体は分子の特別の領域で1つまたは2つのアミノ酸残基が欠失している。

hVEGFのフラグメントおよびアミノ酸配列改変体は当該技術分野の既知の方法、例えば天然因子をコードするDNAの部位指向突然変異によって容易に製造される。突然変異DNAを適当な発現ベクター中に挿入し、その後宿主細胞を組換え体ベクターでトランスフェクションす

る。組換え体宿主細胞と〔sic;are〕適當な培養培地で増殖させ、その後宿主細胞で発現された所望のフラグメントまたはアミノ酸配列改変体をクロマトグラフィーまたは他の精製方法で組換え体細胞培養物から回収する。

或いは、当該技術分野で既知の他の等価の化学合成を使用することができるが、hVEGFのフラグメントおよびアミノ酸改変体は、例えば、天然hVEGFのタンパク質分解によって、またはメリフィールド (Merrifield) (J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963年)) が記載した標準的な固体相ペプチド合成方法を使用する合成によってインビトロで製造される。固体相合成は、保護されたα-アミノ酸を適當な樹脂と結合させてペプチドのC末端から開始される。アミノ酸は、ペプチド結合の形成で当該技術分野で周知の技術を使用してペプチド鎖と結合させる。

治療用途

治療用途では、本発明のアンタゴニストは哺乳動物、好ましくはヒトに、ボーラスとして静脈内にまたは、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液囊内、鞘内、経口、局所若しくは吸入経路で一定期間の連続注入によってヒトに投与できるような形態を含めて、製薬的に許容できる投与形態で投与する。アンタゴニストはまた、腫瘍内、腫瘍周囲、病変内または病変周囲経路で適切に投与されて局所的並びに全身的治療効果を発揮する。腹腔内経路は、例えば、卵巣腫瘍の治療に特に有用である。

このような投与形態は、本来的に非毒性で非治療的な製薬的に許容できる担体を有する。このような担体の例にはイオン交換剤、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えばホスフェート、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩類または電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質およびポリエチレングリコールが含まれる。アンタゴニストの局所用またはゲル系形態用の担体には多糖類、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウムまたはメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよび木ロウアルコールが含まれる。全ての投与で適切には、慣用のデポー形態が使用される。このような形態には、例えば、マイクロカプセル、ナノカプセル、リポソーム、プラスター、吸入形態、鼻用スプレー、舌下錠および徐放製剤が含まれる。アンタゴニストは典型的には、約0.1mg/mlから100mg/mlの濃度で上記媒体に処方される。

徐放製剤の適當な例には、アンタゴニストを含有する固形の疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが含まれ、これらマトリックスは成形物、例えば膜またはマイ

クロカプセルの形態である。徐放製剤マトリックスの例にはポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ランガー（Langer）等、J. Biomed. Mater. Res. 15:167 (1981年) およびランガー、Chem. Tech.、12:98~105 (1982年) に記載されているポリ（2-ヒドロキシエチルーメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号））、L-グルタミン酸とガルマエチル-L-グルタメートのコポリマー（シッドマン（Sidman）等、Biopolymers、22:547 (1983年)）、非分解性エチレン-ビニルアセテート（ランガー等、上記）、ルブロンデポー（Lupron Depot）（登録商標）のような分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（乳酸-グリコール酸コポリマーおよびロイプロリドアセテートで構成される注入可能微小球体）並びにポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。エチレン-ビニルアセテートおよび乳酸-グリコール酸のようなポリマーは100日間以上分子を放出させることができると、或るヒドロゲルはより短い時間タンパク質を放出する。カプセルに入れたポリペプチドアンタゴニストが体内に長時間留まるとき、37°Cで水分に暴露された結果として変性または凝集し、その結果生物学的活性の消失が生じ、多分免疫原性の変化が生じことがある。関係するメカニズムに依存して安定化のために合理的な方策を工夫することができる。例えば、凝集メカニズムがチオジスルフィド交換による分子内S-S結合形成であることが発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分を制御し、適当な添加剤を使用そして特別のポリマーマトリックス組成物を開発することによって達成することができる。

徐放hVEGFアンタゴニスト組成物にはリポソームとして取り入れたアンタゴニスト抗体およびhVEGFrも含まれる。アンタゴニストを含有するリポソームは、エプスタイン（Epstein）等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82:3688 (1985年)；ホワング（Hwang）等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4030 (1980年)；米国特許第4,485,045号；米国特許第4,544,545号に記載されたような当該技術分野で既知の方法で製造される。通常、リポソームは小さい（約200~800オングストローム）単一薄膜タイプであり、その際脂質含量は、最適のHRG療法用に調整されている選択された割合である約30モル%のコレステロールより多い。循環時間が長くなったりリポソームは米国特許第5,013,556号に開示されている。

本願発明のもう1つの使用は成形物中にhVEGFアンタゴニストを導入することが含まれる。このような物品は内皮細胞増殖および脈管形成の調節に使用することができる。加えて、腫瘍侵入および転移をこれら物品で調節することができる。

疾病的予防または治療では、アンタゴニストの適当な投与量が上記で特定した治療すべき疾病的タイプ、疾病的重篤度および経過、抗体が予防目的で投与されるのか

それとも治療目的で投与されるのか、以前の療法、アンタゴニストに対する患者の臨床的履歴および応答、並びに担当医の自由裁量に依存する。アンタゴニストは適切には、1回でまたは一連の治療期間中患者に投与される。

hVEGFアンタゴニストは、種々の新生物および非新生物疾病および疾患の治療に有用である。治療を受けられる新生物および関連状態には乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、結腸直腸癌、肝臓癌、卵巣癌、卵胞膜細胞腫、男性胚腫、頸部癌、子宮内膜癌、子宮内膜過形成、子宮内膜症、絨毛肉腫、絨毛癌、頭部および頸部癌、鼻咽頭癌、喉頭癌、肝芽腫、カボジ肉腫、メラノーマ、皮膚癌、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、脾臓癌、網膜芽腫、星状細胞腫、神経膠芽細胞、シュワン鞘腫、寡突起膠腫、髓芽腫、神経芽腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、平滑筋肉腫、尿路癌、甲状腺癌、ウイルムス腫瘍、腎細胞癌、前立腺癌、母斑症に関連した異常な血管増殖、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連した）並びにメーグス症候群が含まれる。

治療を受けられる非新生物状態にはリウマトイド関節炎、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他の網膜症、後水晶体絨毛増殖症、血管新生性緑内障、甲状腺過形成（バセドウ病を含む）、角膜および他の組織移植、慢性炎症、肺炎症、ネフローゼ症候群、子癥前症、腹水、心膜滲出液（例えば、心膜炎に関連した）、並びに胸膜滲出液が含まれる。

疾病的タイプおよび重篤度に依存して、例えば、1回またはそれより多い分割投与によるかそれとも連続注入によって、約1 μg/kgから15mg/kgのアンタゴニストが患者に投与する初期候補投与量である。典型的な1日投与量は、上記ファクターに依存して約1 μg/kgから100mg/kgまたはそれ以上までの範囲であろう。数日間またはそれより長い反復投与では、状態に依存して、治療は疾病症候群の所望の抑制が生じるまで繰り返される。しかし乍ら、他の投与レジメが有用であることがある。本療法の進行は、例えば放射線写真腫瘍画像化を含む慣用の技術およびアッセイによって容易に監視される。

本発明のもう1つの実施態様に従って、疾病的予防または治療におけるアンタゴニストの有効性は、アンタゴニストを連続してかまたはこれらの目的に有効である別の薬剤、例えば、腫瘍壞死因子（TNF）、酸性若しくは塩基性の絨毛芽細胞増殖因子（FGF）若しくは肝細胞増殖因子（HGF）の脈管形成活性を阻止若しくは無効化し得る抗体、組織因子、タンパク質C若しくはタンパク質Sの凝固活性を阻止若しくは無効化し得る抗体（1991年2月21日に公開されたエスマン（Esmen）等のPCT公開特許第W091/01753号参照）、または例えば、アルキル化剤、葉酸アンタゴニスト、核酸代謝の抗代謝物、抗生物質、ピリミジン類似体、5-フルオロウラシル、プリンスクレオシド、アミン、アミノ酸、トリアゾールヌクレオシド若しくはコルチコステロイドのような1つ若しく

はそれより多い慣用の治療剤と組み合わせて投与することによって改善することができる。このような他の薬剤は投与される組成物中に存在するかまたは別々に投与することができる。更に、アンタゴニストは適切には連続してかまたは、照射に係わるかそれとも放射性物質を投与することに係わる放射線学的治療と組み合わせて投与する。

1つの実施態様では、腫瘍の血管形成を組合せ療法で攻撃する。1つまたはそれより多いhVEGFアンタゴニストを腫瘍患者に、例えば腫瘍または、存在する場合には、その転移病巣の壊死を観察して決定される治療的に有効な投与量で投与する。この療法は、もはや更なる有益な効果が観察されないかまたは臨床検査で痕跡量の腫瘍も示されないか若しくはどんな転移病巣も示されないようなときまで継続する。次に、TNFを単独でかまたは補助的薬剤、例えばアルファー、ベーター若しくはガムマーアンターフェロン、抗-HER2抗体、ヘレグリン、抗ヘレグリン抗体、D因子、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) または、抗タンパク質C抗体、抗タンパク質S抗体若しくはC4b結合タンパク質 (1991年2月21日に公開されたエスモン等のPCT公開特許第W091/01753号参照) のような腫瘍の毛細血管凝固を促進する薬剤、または加熱若しくは照射と組み合わせて投与する。

補助的薬剤は有効性を変えるので、慣用の態様でマトリックスクリーニングによってそれらが腫瘍に与える影響を比較することが望ましい。hVEGFアンタゴニストおよびTNFの投与は、所望の臨床結果が達成されるまで繰り返す。或いは、hVEGFアンタゴニストはTNFおよび、任意に、補助的薬剤と一緒に投与される。固体腫瘍が四肢または全身循環から隔離し易い他の場所に見られる場合、本願明細書に記載した治療薬剤は隔離された腫瘍または器官に投与する。他の実施態様では、FGFまたは血小板由来増殖因子 (PDGF) アンタゴニスト、例えば抗体を無効化する抗FGFまたは抗PDGFがhVEGFアンタゴニストと一緒に患者に投与される。hVEGFアンタゴニストによる治療は任意に、外傷治癒または所望の血管新形成の期間中止することができる。

他の用途

本発明の抗hVEGF抗体はまた、アフィニティー精製物質としても有用である。この方法では、hVEGFに対する抗体を当該技術分野で周知の方法を使用してセファデックス樹脂またはろ紙のような支持体上に固定する。次に、固定した抗体を精製すべきhVEGFを含有する試料と接触させ、その後、固定された抗体と結合しているhVEGF以外の試料中の物質を全て実質的に除去する適当な溶媒で支持体を洗浄する。最後に、抗体からhVEGFを放出させるグリシン緩衝液、pH5.0のような別の適当な溶媒を用いて支持体を洗浄する。

以下の実施例は説明のためだけに提供するものであって、いずれの態様においても本発明を限定するように意図するものではない。

実施例1

抗hVEGFモノクローナル抗体の製造

免疫化用のオガイヘモシアン (KLH) と抱合したhVEGFを得るために、組換え体hVEGF (165アミノ酸) 、リュング等、*Science* 246:1306 (1989年) を0.05%グルタルアルデヒドの存在下4:1の比率でKLHと混合し、そしてこの混合物を穏やかに攪拌し乍ら室温で3時間インキュベートした。次に、この混合物をリン酸緩衝溶液 (PBS) に対して4℃で一夜透析した。

Balb/cマウスは、腹腔内注射によって20μgのKLHと抱合した5μgのhVEGFで2週間毎に4回免疫化し、細胞融合前に4日間KLHと抱合したhVEGFの同一投与量を追加投与した。

免疫化したマウスから得た脾細胞はP3X63Ag8U.1ミエローマ細胞、エルトン等、*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1.81:1 (1978年) と、記載されたようにして35%のポリエチレングリコール (PEG) を使用して融合させた。ヤーマッシュ (Yarmush) 等、*Proc. Nat. Acad. Sci.* 77:2899 (1980年) 。ハイブリドーマをHAT培地で選択した。

ハイブリドーマ細胞培養物から得た上清液は、hVEGF被覆微量滴定プレートを使用するELISAアッセイによって抗hVEGF抗体産生についてスクリーニングした。各ウエル中のhVEGFと結合した抗体を、アルカリホスファターゼ抱合ヤギ抗マウスIgG免疫グロブリンおよび色素產生基質p-ニトロフェニルホスフェートを使用して測定した。ハーロー (Harlow) およびレーン (Lane) の抗体：実験室マニュアル、597頁 (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988年) 。このようにして抗hVEGF抗体を產生することが測定されたハイブリドーマ細胞は限界希釈によってサブクローン化し、更に試験するために、A4.6.1およびB2.6.2と命名したこれらクローンの2つを選択した。

実施例2

抗hVEGFモノクローナル抗体の特徴決定

A. 抗原の特異性

A4.6.1およびB2.6.2ハイブリドーマによって產生された抗hVEGFモノクローナル抗体の結合特異性はELISAで測定した。モノクローナル抗体は、hVEGF、FGF、HGFまたは表皮増殖因子 (EGF) で前以て被覆された微量滴定プレートのウエルに加えた。ペルオキシダーゼ抱合ヤギ抗マウスIgG免疫グロブリンを用いて結合抗体を検出した。これらアッセイの結果、A4.6.1およびB2.6.2ハイブリドーマが產生したモノクローナル抗体はhVEGFとは結合するが他のタンパク質増殖因子とは検出できるほどには結合しないことが確認された。

B. エピトープのマッピング

競合結合ELISAを使用して、A4.6.1およびB2.6.2ハイ

ブリドーマが産生したモノクローナル抗体がhVEGF内の同一のエピトープ（部位）に結合するのかそれとも異なるエピトープ（部位）に結合するのかを決定した。キム等、*Infect. Immun.* 57:944 (1989年)。個々の非標識抗hVEGFモノクローナル抗体 (A4. 6. 1またはB2. 6. 2) または無関係の抗HGF抗体 (IgG1イソタイプ) を、hVEGFで前以て被覆された微量滴定プレートのウエルに加えた。次に、ビオチニル化抗hVEGFモノクローナル抗体 (B10-A4. 6. 1またはB10-B2. 6. 2) を加えた。ビオチニル化抗体対非標識抗体の比率は1:1000であった。ビオチニル化抗体の結合は、アビシン抱合ペルオキシダーゼ、続いてo-フェニレンジアミンジヒドロクロリドおよび過酸化水素を添加して視覚化した。結合したビオチニル化抗体の量を示す着色反応は、495nmの波長で光学密度 (0. D.) を測定した。

図1に示されるように、各々の場合に、ビオチニル化抗hVEGF抗体の結合は対応する非標識抗体で阻止されたが、他の非標識抗hVEGF抗体または抗HGF抗体では阻止されなかった。これらの結果は、A4. 6. 1およびB2. 6. 2ハイブリドーマが産生したモノクローナル抗体がhVEGF内の種々のエピトープと結合することを示している。

C. イソタイプ決定

A4. 6. 1およびB2. 6. 2ハイブリドーマが産生した抗hVEGFモノクローナル抗体のイソタイプはELISAで決定した。各ハイブリドーマが増殖している培養培地の試料（上清液）をhVEGFで前以て被覆された微量滴定プレートに加えた。捕捉された抗hVEGFモノクローナル抗体は、種々のイソタイプ特異性のアルカリホスファターゼ抱合ヤギ抗マウス免疫グロブリンと共にインキュベートし、抱合抗体と抗hVEGFモノクローナル抗体との結合はp-ニトロフェニルホスフェートを添加して測定した。着色反応はELISAプレート読取り器を用いて405nmで測定した。

上記方法によって、A4. 6. 1およびB2. 6. 2ハイブリドーマの両方で産生したモノクローナル抗体のイソタイプはIgG1であると決定された。

D. 結合親和性

A4. 6. 1およびB2. 6. 2ハイブリドーマが産生した抗hVEGFモノクローナル抗体のhVEGFに対する親和性は競合結合アッセイで測定した。予め定めた最適以下の濃度のモノクローナル抗体を、20,000~40,000cpmの¹²⁵I-hVEGF (1~2ng) および種々の既知量の非標識hVEGF (1~100ng) を含有する試料に加えた。室温で1時間後、100μlのヤギ抗マウスIgG抗血清（米国アーカンソー州ロジャーズのPel-Freez）を加え、この混合物を室温で更に1時間インキュベートした。抗体と結合タンパク質のコンプレックス（免疫コンプレックス）は、4℃で6%ボリエチレンリコール (PEG、分子量8000) を500μl添加し、続いて2000×G、4℃で20分間遠心して沈殿させた。各試料中の抗hVEGFモノクローナル抗体と結合した¹²⁵I-hVEGFの量はペレット化した材料をガンマ計数器で

計数して測定した。

親和性定数はスカッチャード分析によってデータから計算した。A4. 6. 1ハイブリドーマが産生した抗hVEGFモノクローナル抗体の親和性は 1.2×10^9 リットル/モルであると計算された。B2. 6. 2ハイブリドーマが産生した抗hVEGFモノクローナル抗体の親和性は 2.5×10^9 リットル (SIC; liters) /モルであると計算された。

E. hVEGFの細胞分裂誘起活性の阻止

ウシ副腎皮質毛細血管内皮 (ACE) 細胞、フェララ等、*Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:5773 (1987年) を12個のマルチウエルプレート中 10^4 個の細胞/mlの密度で接種し、2.5ng/mlのhVEGFを、A4. 6. 1若しくはB2. 6. 2ハイブリドーマが産生した種々の濃度の抗hVEGFモノクローナル抗体または無関係の抗HGFモノクローナル抗体の存在下または不存在下で各ウエルに加えた。5日間培養後、各ウエルの細胞数をコルター・カウンターで計測した。対照として、hVEGFを添加しないでACE細胞を培養した。

図2に示されるように、抗hVEGFモノクローナル抗体は両方とも、添加したhVEGFがウシACE細胞の増殖または生存を支持できることを示した。A4. 6. 1ハイブリドーマが産生したモノクローナル抗体はhVEGFの細胞分裂誘起活性を完全に阻止し（約90%以上の阻止）、一方B2. 6. 2が産生したモノクローナル抗体はhVEGFの細胞分裂誘起活性を部分的にしか阻止しなかった。

F. hVEGF結合の阻止

ウシACE細胞を、10%の仔ウシ血清、2mMのグルタミンおよび1ng/mlの塩基性纖維芽細胞増殖因子を含有するダルベッコの修正イーグル培地 (DMEM) 中24のウエルの微量滴定プレートに 2.5×10^4 個の細胞/0.5ml/ウエルの密度で接種した。一夜培養した後、細胞を4℃で結合用緩衝液（等量のDMEMおよびF12培地プラス25mMのHEPESおよび1%のウシ血清アルブミン）を用いて1回洗浄した。

12,000cpmの¹²⁵I-hVEGF (約 5×10^4 cpm/ng/ml) を、A4. 6. 1、B2. 6. 2またはA2. 6. 1ハイブリドーマ (250μlの総容量) が産生した抗hVEGFモノクローナル抗体5μgと共に30分間予めインキュベートし、その後この混合物を微量滴定プレート中のウシACE細胞に加えた。細胞を4℃で3時間インキュベートした後、細胞を4℃で結合用緩衝液を用いて3回洗浄し、0.5mlの0.2N、NaOHを添加して溶解させ、ガンマ計数器で計数した。

図3（上）に示されるように、A4. 6. 1およびB2. 6. 2ハイブリドーマが産生した抗hVEGFモノクローナル抗体はhVEGFとウシACE細胞の結合を阻止した。対照的に、A2. 6. 1ハイブリドーマが産生した抗hVEGFモノクローナル抗体はhVEGFとウシACE細胞の結合に与える明白な影響はなかった。上記した細胞増殖アッセイで得た結果と一致して、A4. 6. 1ハイブリドーマが産生したモノクローナル抗体はB2. 6. 2が産生したモノクローナル抗体より非常に大きくhVEGFの結合を阻止した。

図3（下）に示されるように、A4. 6. 1ハイブリドーマ

が產生したモノクローナル抗体は、1:250のhVEGF対抗体のモル比でhVEGFとウシACE細胞の結合を完全に阻止した。

G.他のVEGFイソ形態との交差反応性

A4.6.1ハイブリドーマが產生した抗hVEGFモノクローナル抗体がhVEGFの121-および189-アミノ酸形態と反応性であるかどうかを決定するために、抗体がこれらのポリペプチドを免疫沈降させる能力について抗体をアッセイした。

ヒト293細胞を、上記したようにして、121-および189-アミノ酸hVEGFポリペプチドの配列をコードするヌクレオチドを有するベクターでトランスフェクションした。リュング等、*Science* 246:1306 (1988年)。トランスフェクションして2日後、システィンおよびメチオニンを欠く培地に細胞を移した。細胞を上記培地中で30分間インキュベートし、その後 $100\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の各 ^{35}S -メチオニンおよび ^{35}S -システィンを培地に加え、細胞を更に2時間インキュベートした。細胞を血清不含培地に移し、3時間インキュベートすることによって標識付けを追求した。細胞培養培地を集め、溶解緩衝液 (150mM NaCl、1%NP40、0.5%デオキシコレート、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、50mMトリス、pH8.0) 中で30分間インキュベートして細胞を溶解させた。細胞屑は、20 $\times G$ で30分間遠心して溶解物から除去した。

細胞培養培地および細胞溶解物の $500\mu\text{l}$ は、 $2\mu\text{l}$ のA4.6.1ハイブリドーマ抗体 (2.4mg/ml)と共に4℃で1時間インキュベートし、その後 $5\mu\text{l}$ のウサギ抗マウスIgG免疫グロブリンと共に4℃で1時間インキュベートした。 ^{35}S -標識hVEGFと抗hVEGFモノクローナル抗体の免疫コンプレックスをタンパク質Aセファロース (Pharmacia) で沈殿させ、その後還元条件下でSDS-12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付した。免疫沈降させ、放射標識したタンパク質をオートラジオグラフィーで分析するため、ゲルをX線フィルムに暴露した。

上記分析の結果、A4.6.1ハイブリドーマが產生した抗hVEGFモノクローナル抗体がhVEGFの121-および189-アミノ酸形態と交差反応性であることが示された。

実施例3

hVEGFレセプター-IgG融合タンパク質の製造

flt hVEGFレセプターのヌクレオチドおよびアミノ酸コード化配列はシブヤ等、*Oncogene* 5:519~524 (1990年) に開示されている。flt hVEGFレセプターの細胞外ドメインのコード化配列を2段階方法でヒトIgG1鎖のコード化配列に融合させた。

部位指向突然変異を使用してBstB1制限を部位5' fltをコードするDNA中に、fltのアミノ酸759のコドンに導入し、プラスミドpBSSK' FC、ベネット等、*J. Biol. Chem.* 266:23060~23067 (1991年) の特有のBstE11制限部位をBstB1部位に変換した。修正したプラスミドをEcoR1およびBstB1で消化し、そして得られたプラスミドDNAの大きい

フラグメントを、flt hVEGFレセプターの細胞外ドメイン ((アミノ酸1~758) をコードするflt DNAのEcoR1-BstB1フラグメントと一緒に結合させた。

得られた構築物は、ClaIおよびNotIで消化して約3.3kbのフラグメントを生成させ、次にこれを結合によって哺乳動物発現ベクターpHEB02 (リュング等、*Neuron* 8:1045 (1992年)) の複数のクローニング部位に挿入する。3.3kbのフラグメントの末端を、例えばリンカーを添加して修飾して、正しい発現方向でのベクターへのフラグメント挿入が得られる。

哺乳動物宿主細胞 (例えば、CEN4細胞 (リュング等、上述)) はエレクトロポーレーションによってflt挿入物を含有するpHEB02プラスミドでトランスフェクションする。トランスフェクションされた細胞は約10%のウシ胎児血清、2mMのグルタミンおよび抗生素質を含有する培地中で培養し、約75%の集密度で血清不含培地に移した。培地は3~4日間調整した後に集め、そしてflt-IgG融合タンパク質は、本質的にベネット等、*J. Biol. Chem.* 266:23060~23067 (1991年) に記載されたようにして、タンパク質Aアフィニティーマトリックスでクロマトグラフィーにかけて条件づけ培地から精製する。

実施例4

hVEGFアンタゴニストによる腫瘍増殖の阻止

培養物中で増殖している種々のヒト腫瘍細胞株はhVEGFの產生についてELISAでアッセイした。卵巣、肺、結腸、胃、胸および脳腫瘍細胞株はhVEGFを產生することが判った。更に試験するため、hVEGFを產生する3つの細胞株、NEG55 (G55とも称される) (G55とも称されるドイツ ハンブルグのエッペンドル夫大学病院神経外科部のDr. M. ウエストファル (Westphal) から得たヒト神経膠腫細胞株)、A-673 (細胞株番号CRL 1598として20852米国メリーランド州ロックビルの米国菌培養収集所 (ATCC) から得たヒト横紋筋肉腫細胞株) およびSK-LM S-1 (細胞株番号HTB 88としてATCCから得た平滑筋肉腫細胞株) を使用した。

生後6~10週間の雌ベージュ/ヌードマウス (米国マサチューセッツ州ウィルミントンのCharles River Laboratory) に $100\sim200\mu\text{l}$ のPBS中 $1\sim5\times10^6$ 個の腫瘍細胞を皮下注射した。腫瘍増殖を確立した後種々の時間で、種々の投与量のA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体、無関係の抗gp120モノクローナル抗体 (5B6) またはPBSを1週間当たり1回または2回マウスに腹腔内注射した。腫瘍サイズを毎週測定し、試験終結時に腫瘍を切開し重量を測定した。

マウスのNEG55腫瘍の増殖に与える種々の量のA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体の効果は図4および5に示す。図4は、NEG55細胞を接種して1週間後に開始し $25\mu\text{g}$ または $100\mu\text{g}$ のA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体で処置したマウスを無関係の抗体またはPBSで処置したマウスと比較したとき、腫瘍増殖速度が実質的に減少し

ていたことを示している。図5は、NEG55細胞を接種して5週間後に、A4.6.1抗hVEGF抗体で処置したマウスの腫瘍の大きさが無関係抗体またはPBSで処置したマウスの腫瘍の大きさより約50%（ $25\mu\text{g}$ 投与量の抗体で処置したマウスの場合）から85%（ $100\mu\text{g}$ 投与量の抗体で処置したマウスの場合）小さかったことを示している。

マウスのSK-LMS-1腫瘍の増殖に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体処置の効果は図6に示す。SK-LMS-1細胞を接種して5週間後に、A4.6.1抗hVEGF抗体で処置したマウスの腫瘍の大きさは、無関係抗体またはPBSで処置したマウスの腫瘍の大きさより約75%小さかった。

マウスのA673腫瘍の増殖に与えるA4.6.1抗hVEGFモノクローナル抗体処置の効果は図7に示す。A673細胞を接種して4週間後に、A4.6.1抗hVEGF抗体で処置したマウスの腫瘍の平均的な大きさは、無関係抗体またはPBSで処置したマウスの腫瘍の大きさより約60%（ $10\mu\text{g}$ 投与量の抗体で処置したマウスの場合）から90%以上（ $50\sim400\mu\text{g}$ 投与量の抗体で処置したマウスの場合）小さかった。

実施例5

培養物中で増殖している腫瘍細胞に与える抗hVEGF抗体の直接的な効果の分析

NEG55ヒト神経膠腫細胞またはA673横紋筋肉腫細胞を、10%のウシ胎児血清、2mMのグルタミンおよび抗生素質を含有するF12/DMEM培地のマルチウェルプレート（12ウェル/プレート）内で 7×10^3 個の細胞/ウェルの密度で接種した。次に、A4.6.1抗hVEGF抗体を最終濃度が $0\sim20.0\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように細胞培養物に加えた。5日後、ウェル内で増殖している細胞を、トリプシンに暴露して分離させ、クールター（Coulter）計数器で計数した。

図8および9はこれらの試験結果を示す。明らかにA4.6.1抗hVEGF抗体は、培養物中のNEG55またはA673細胞の増殖に対して顕著な効果を有していないかった。これらの結果は、A4.6.1抗hVEGF抗体が細胞毒性でないことを示しており、抗体の観察された抗腫瘍効果はVEGF介在性血管新形成の阻止によるものであることを強く示している。

実施例6

内皮細胞走化性に与える抗hVEGF抗体の効果

内皮細胞並びに、単球およびリンパ球を含む他の細胞の走化性はリウマトイド関節炎の病原論で重要な役割を果たしている。内皮細胞の移動および増殖はリウマトイド滑膜内で生起する脈管形成を伴う。血管形成性組織（パンヌス）は関節軟骨に侵入し、これを破壊する。

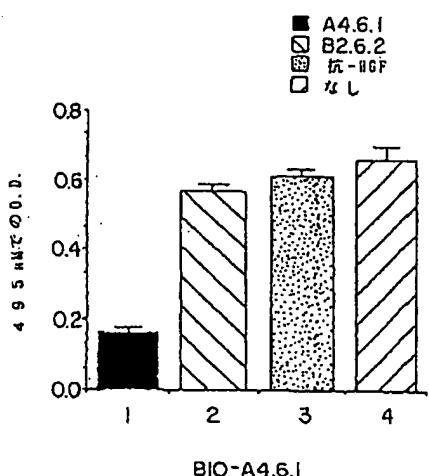
hVEGFアンタゴニストがこの過程を妨げるかどうかを決定するために、本願発明者は、リウマトイド関節炎患者から得られる滑膜液で刺激した内皮細胞の走化性に与えるA4.6.1抗hVEGF抗体の効果をアッセイした。対照として、本願発明者は骨関節炎（リウマトイド関節炎で生じる脈管形成は骨関節炎では生じない）患者から得られる滑膜液で刺激した内皮細胞の走化性に与えるA4.6.1抗hVEGF抗体の効果もアッセイした。

内皮細胞の走化性は確立された方法に従って、修正したボイデンチェンバーズを使用してアッセイした。トンプソン（Thompson）等、Cancer Res. 51:2670 (1991年)；フィリップス（Phillips）等、Proc. Exp. Biol. Med. 197:458 (1991年)。約 10^4 個のヒト臍静脈内皮細胞は、0.1%のウシ胎児血清を含有する培養培地で48ウェルのマルチウェルマイクロチャンバー中にゼラチン被覆フィルター（0.8ミクロンの孔サイズ）に接着させた。約2時間後、チャンバーの上下を逆にし、そして試験試料（リウマトイド関節炎滑膜液、骨関節炎滑膜液、塩基性FGF（bFGF））（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度までか、またはPBS）およびA4.6.1抗hVEGF抗体（ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度まで）をウェルに加えた。2乃至4時間後、移動した細胞を染色しそして計数した。

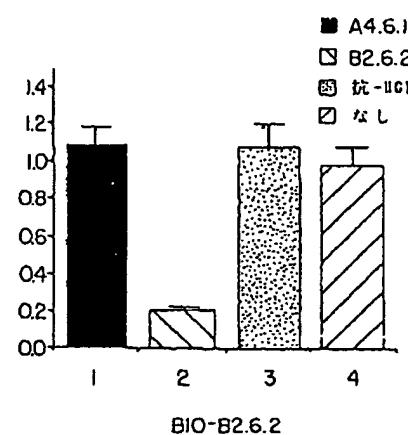
図10は上記試験の結果の平均を示すものである。「滑膜液」と表示した欄および対照に関する頁の下部に示された値は滑膜液、pFGFまたはPBS単独の存在下で移動した内皮細胞の平均数である。「滑膜液+mAB VEGF」と表示した欄の値は、滑膜液プラス添加したA4.6.1抗hVEGF抗体の存在下で移動した内皮細胞の平均数である。

「抑制、%」と表示した欄の値は、抗hVEGF抗体の添加により生じた滑膜液誘発内皮細胞移動の低下ペーセントを示す。示されているように、抗hVEGF抗体は、リウマトイド関節炎の滑膜液が内皮細胞の移動を誘発する能力を顕著に阻止する（平均53.40ペーセントの阻止）が、骨関節炎の滑膜液はそうではなかった（平均13.64ペーセントの阻止）。

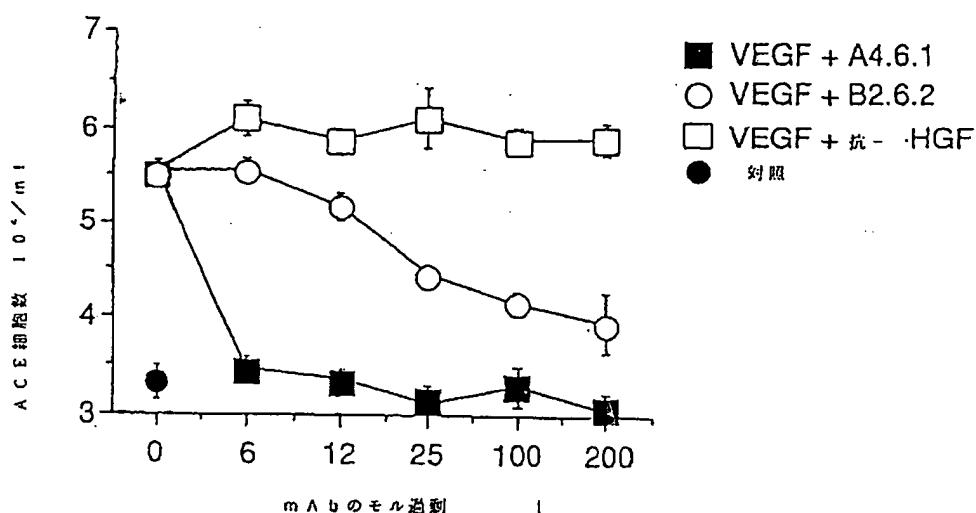
【第1 a図】



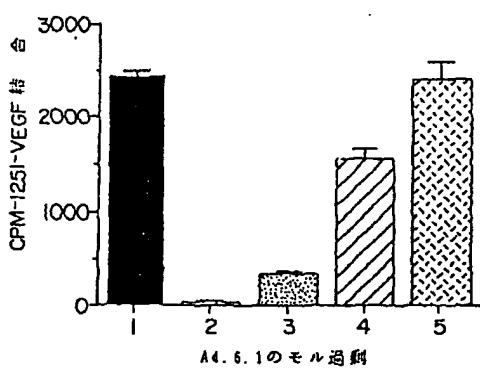
【第1 b図】



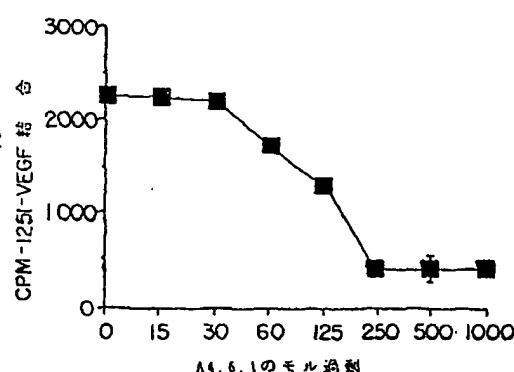
【第2図】



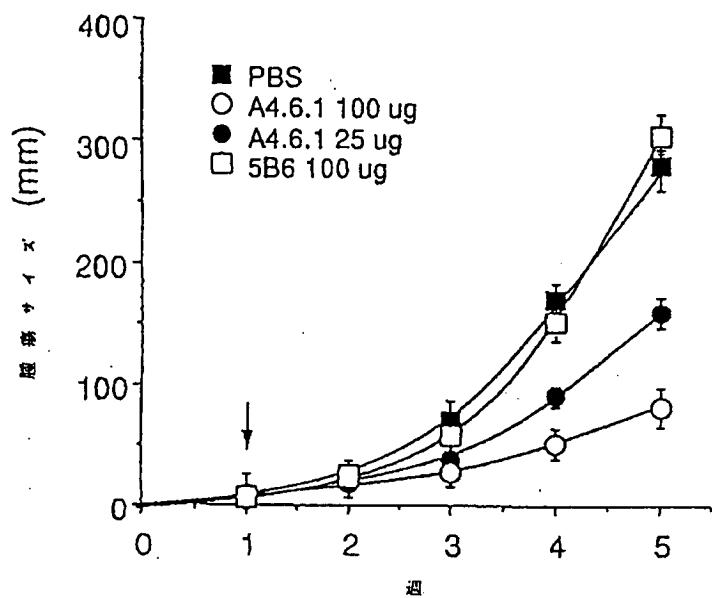
【第3 a図】



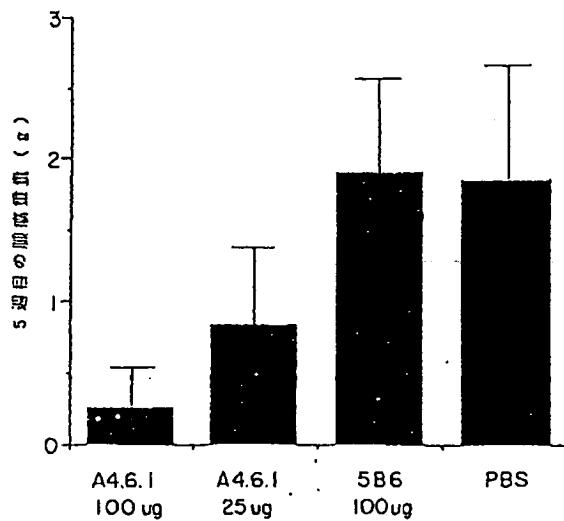
【第3 b図】



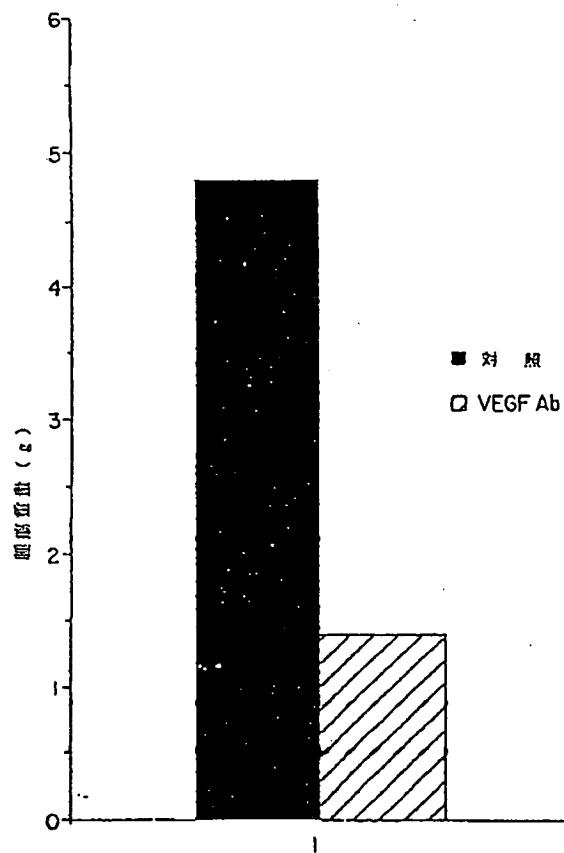
【第4図】



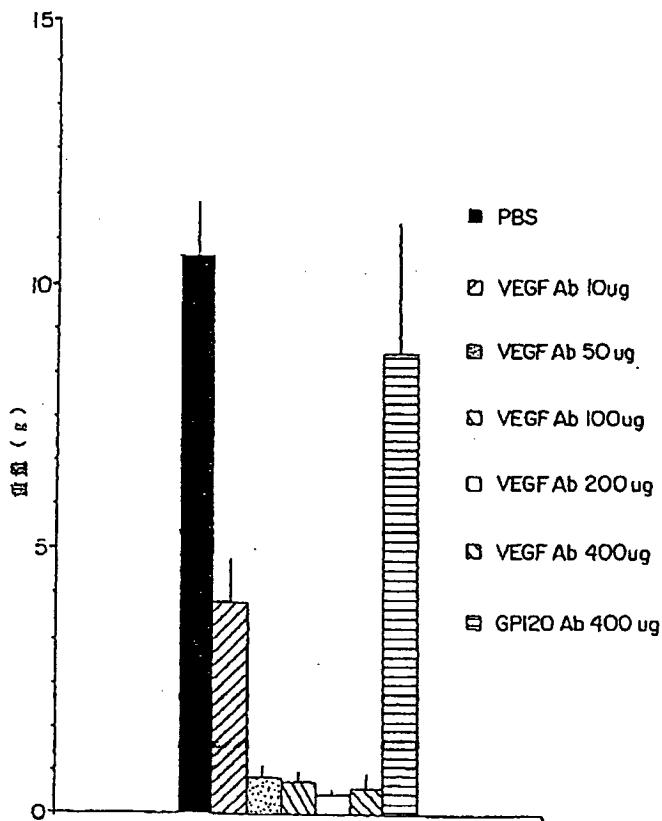
【第5図】



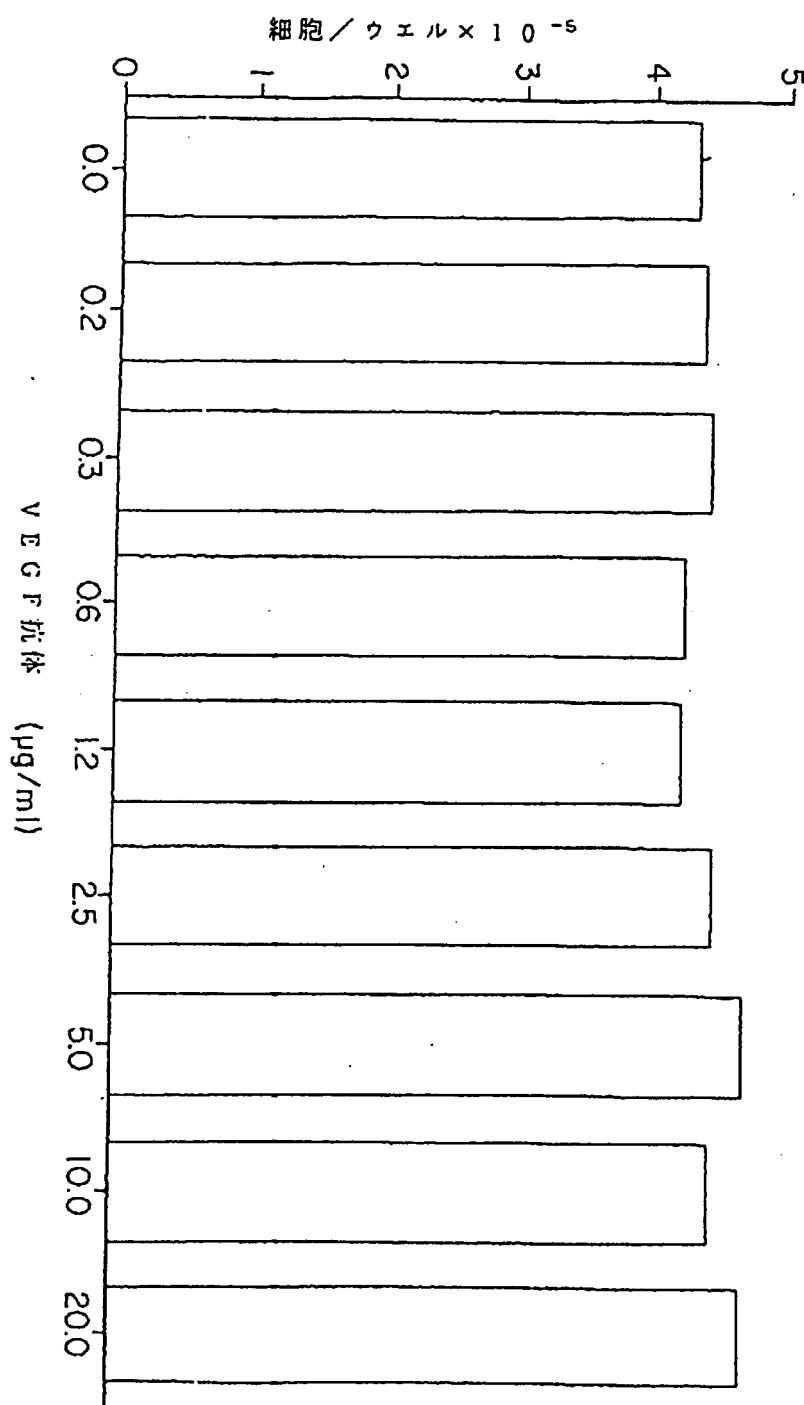
【第6図】



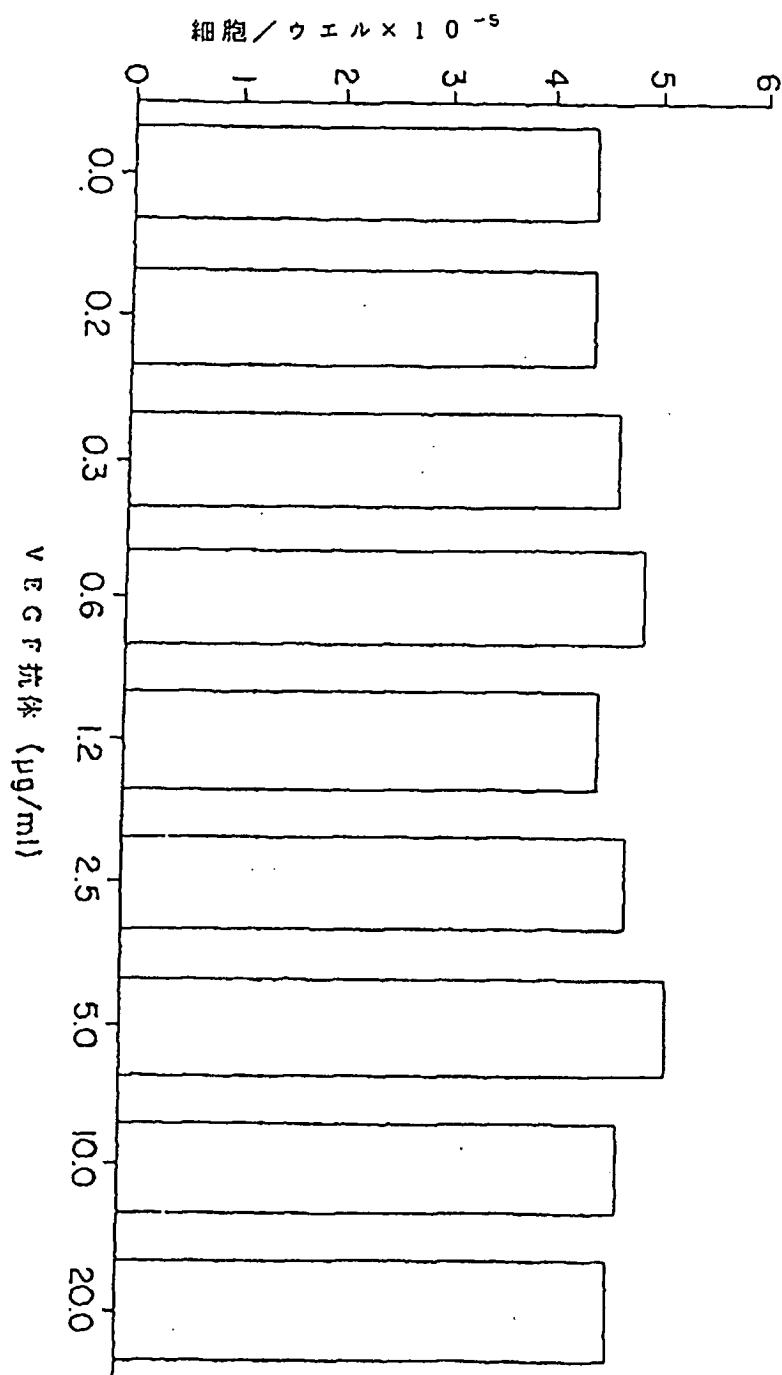
【第7図】



【第8図】



【第9図】



【第10図】

試料タイプ	試料番号	T ₁ t ₁ 日	滑膜液	滑膜液 + mAB VEGF	% 抑制
滑膜液	318	5.7.92	5.2±0.2	2.7±0.3	48
	150	5.7.92	7.0±0.3	2.8±0.4	60
	312	5.7.92	6.7±0.4	3.7±0.3	45
	264	5.7.92	6.2±0.4	3.1±0.3	50
	267	5.7.92	5.7±0.6	4.4±0.3	23
	202	5.22.92	10.0±0.5	3.4±0.6	66
	314	5.22.92	7.5±0.3	3.1±0.6	59
	237	5.22.92	6.1±0.5	2.2±0.3	64
	206	5.22.92	6.7±0.5	2.2±0.3	67
	317	5.22.92	5.2±0.3	2.5±0.6	52
骨関節炎 滑膜液	165	6.2.92	4.0±0.3	2.8±0.4	30
	211	6.2.92	3.4±0.5	3.0±0.2	11.7
	195	6.2.92	3.5±0.2	3.3±0.3	5.7
	122	6.2.92	3.7±0.3	3.2±0.4	13.5
	16	6.2.92	4.1±0.3	3.8±0.5	7.3

RA液に対する平均抑制% 53.4 4.2

OA液に対する平均抑制% 13.6 3.9

滑膜液は1:50に希釈

対照:

6.2.92	PBS	3.3 0.30
	bFGF 1μg/ml	3.7 0.38

5.22.92	PBS	1.2 0.38
	bFGF 1μg/ml	7.8 0.31

5.2.92	PBS	1.3 0.18
	bFGF 1μg/ml	9.0 0.41

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 1 2 P 21/02

C 1 2 N 15/00

C

21/08

A

(56)参考文献

Journal of Cellul

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

ar Biochemistry

BIOSIS (DIALOG)

(1991), Suppl. no. 15F, ,

EUROPAT (QUESTEL)

p. 251

WPI (DIALOG)

The Journal of Biological Chemistry

(1989), 264 (33), p. 20017-

20024

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.